

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE TRATAMENTO ULTRAVIOLETA NO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DE  
ÁGUA DE COCO ASSOCIADO A DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS

JUNIA BERZIN GRAPIGLIA

ORIENTADOR(A):  
Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

TUTOR(A):  
Dra. Brigitte Bertin

2021



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE TRATAMENTO ULTRAVIOLETA NO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DE  
ÁGUA DE COCO ASSOCIADO A DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS

JUNIA BERZIN GRAPIGLIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho  
Monteiro de Oliveira

ORIENTADOR(A):

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá  
Henriques

TUTOR(A):

Dra. Brigitte Bertin

2021

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: JUNIA BERZIN GRAPIGLIA

Título da Tese ou  
Dissertação: UTILIZAÇÃO DE TRATAMENTO ULTRAVIOLETA NO PROCESSAMENTO  
INDUSTRIAL DE ÁGUA DE COCO ASSOCIADO A DIFERENTES  
TRATAMENTOS TÉRMICOS

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas  
públicas): 2021

Designação do curso  
de Mestrado ou de  
Doutoramento: MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☒ Produção Animal e Segurança Alimentar  
☐ Morfologia e Função ☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

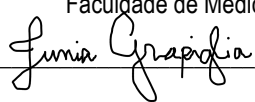
1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 16 de março de 2021

Assinatura: 

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar e sempre a minha família, que mais uma vez me proporcionaram todo suporte necessário para obter mais uma conquista na minha vida. Sem vocês eu não estaria aqui, muito obrigada. Obrigada aos meus pais por sempre me impulsionarem a lutar pelos meus sonhos. Obrigada a minha irmã que me apoiou ativamente durante todo o mestrado, você é o meu exemplo.

Muito obrigada a Doutora Ana Rita por ter aceitado ser a minha orientadora. Uma profissional e mulher incrível que eu admiro e foi inspiração para mim desde o primeiro dia de aula do Mestrado. Obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos.

Obrigada a todos meus amigos Carla, Deniz, Izadora e Joanna pelo suporte emocional, palavras de apoio, e conselhos durante este ano desafiador, sem vocês não seria possível superar todas as etapas necessárias para chegar aqui.

Obrigada a Universidade de Lisboa e todos os professores do Mestrado em Segurança Alimentar pelo curso incrível que nos foi proporcionado, sou grata por todas as portas que já se abriram e que ainda vão se abrir após essa experiência incrível e enriquecedora.

Obrigada a todos que acreditaram em mim.

## Resumo

Com o intuito de tornar possível o consumo de água de coco fora das regiões produtoras, torna-se fundamental a sua industrialização. O processamento térmico é usado como forma efetiva na conservação dos alimentos. Entretanto, em alguns casos o uso do calor pode afetar o produto final de forma negativa, levando a alterações sensoriais e físico-químicas do produto. Alguns processos não térmicos vêm sendo aplicados para a conservação de alimentos sem causar os efeitos adversos do uso do calor. Um desses processos é o tratamento de alimentos com luz ultravioleta, que tem sido bastante estudada pela eficiência na inativação microbiológica em água, sucos e em superfícies de diversos materiais. Este trabalho tem por objetivo a avaliação microbiológica de amostras de água de coco processada industrialmente com aplicação de raios ultravioletas de forma experimental combinada com diferentes tratamentos térmicos, como congelação e refrigeração, visando a conservação e segurança do produto final para o consumidor. As análises realizadas consistiram na Pesquisa de *Salmonella* spp, (ISO 6887-5:2010) e *Escherichia coli* (ISO 4831:2012), quantificação de coliformes totais e termotolerantes (ISO 4831:2012), mesófilos totais (ISO 6611:2004) e bolores e leveduras (ISO 4833-1:2013). Verificou-se a diminuição da carga microbiológica das amostras tratadas com ultravioleta quando comparadas com amostras submetidas a outro tratamento térmico, resultados compatíveis com os obtidos em estudos semelhantes em sumos. Para validação dos protocolos é fundamental que este estudo seja desenvolvido com um número maior de amostras, diferentes lotes e pesquisa de outros grupos de microrganismos.

**PALAVRAS-CHAVES:** água de coco; avaliação microbiológica; congelação; refrigeração; ultravioleta.

## Abstract

In order to make it possible to consume and commercialize coconut water in distant regions from the production sites, industrialization of coconut water production is needed. During the bottling procedure for coconut water, the fruit goes through an external cleaning before opening. Thermal processing is an effective way to preserve food. However, in some cases the use of heat can negatively affect the final product, leading to sensorial and physical-chemical changes. Some non-thermal processes have been studied and applied to preserve food without causing the adverse effects of using heat. One of these processes is the treatment of food with ultraviolet light, which has been studied extensively for its efficiency in microbiological inactivation of water, juices and on surfaces of different materials. This work aimed to perform a microbiological evaluation of industrially prepared coconut water samples with the application of ultraviolet light combined with different thermal treatments, such as freezing and refrigeration, aiming at the conservation and safety of the final product for the consumer. The analyzes performed consisted of the identification of *Salmonella* spp, (ISO 6887-5: 2010) and *Escherichia coli* (ISO 4831: 2012), quantification of total and thermotolerant coliforms (ISO 4831: 2012), mesophiles (ISO 6611: 2004) and molds and yeasts (ISO 4833-1: 2013). Results revealed a decrease in the microbiological load of samples treated with ultraviolet when compared to samples submitted exclusively to thermal treatment. In future studies, for protocol validation purposes it will be essential to include a higher number of samples, belonging to different batches and also to investigate other groups of microorganisms.

KEYWORDS: coconut water; microbiological evaluation; freezing; refrigeration; ultraviolet.

## Índice Geral

Índice de Figuras	x
Índice de Gráficos	xi
Índice de tabelas	xii
Índice de abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
2. Objetivo	3
3. Revisão bibliográfica	4
3.1. Avaliação microbiológica dos alimentos	4
3.2. Análises microbiológicas da água de coco “ <i>in natura</i> ”	5
3.3. Tipos de consumo e tratamento empregados na conservação da água de coco	7
3.3.1. Água de coco verde “ <i>in natura</i> ”	8
3.3.2. Prevenção do desenvolvimento bacteriano	8
3.3.2.1. Embalagem	8
3.3.2.2. Arrefecimento	9
3.3.2.3. Congelação	10
3.3.2.4. Ultracongelamento	10
3.3.3. Redução da carga microbiana	11
3.3.3.1. Pasteurização	11
3.3.3.2. Esterilização / UHT	11
3.3.3.3. Filtração	11
3.3.3.4. Uso de radiações ultravioletas em alimentos	12
3.3.3.5. Inativação dos microrganismos pela radiação ultravioleta	13
3.3.3.6. Uso do ultravioleta para preservação de alimentos	14
4. Material e métodos	14
4.1. Protocolo para o estudo	14
4.2. Recolha das amostras	15
4.3. Pesagem e preparação da amostra em geral	16
4.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	17
4.4.1. Testes Confirmatórios	18
4.4.1.1. Teste do indol	18
4.4.1.2. Teste sorológico	18
4.5. Contagem de Coliformes totais	18
4.5.1. Teste presuntivo	18
4.5.2. Confirmação de coliformes totais	19
4.6. Contagem de Coliformes Termotolerantes	19
4.7. Contagem de <i>Escherichia Coli</i>	20



4.7.1. Teste Indol	20
4.7.2. Meio Eosina Azul de Metileno (EMB)	20
4.8. Contagem de bolores e leveduras	20
4.9. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos	20
5. Delineamento experimental	21
5.1. Análise microbiológica para controlo de qualidade interno	21
5.2. Tratamento com radiação ultravioleta	21
5.3. Protocolos de aplicação de radiação ultravioleta	21
5.4. Protocolo 1	22
5.5. Protocolo 2	22
5.6. Protocolo 3	23
6. Análise de Dados	23
7. Resultados e Discussão	23
7.1. Análise microbiológica para controlo de qualidade	24
7.1.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em 25 ml	24
7.1.2. Contagem de coliformes totais	24
7.1.3. Contagem de coliformes termotolerantes	24
7.1.4. Pesquisa e quantificação de <i>Escherichia coli</i>	25
7.2. Protocolos com uso de tratamento ultravioleta	25
7.2.1. Resultado do protocolo 1	25
7.2.2. Resultado do protocolo 2	26
7.2.3. Resultado do protocolo 3	27
7.2.4. Resultados de acordo com tratamento térmico - Ultracongelção a -30°C	27
7.2.5. Resultados de acordo com tratamento térmico – Refrigeração a 0-5°C	34
8. Conclusão	38
10. Bibliografia	45

## **Índice de Figuras**

Figura 1: Venda ambulante de água de coco - Rio de Janeiro, Brasil (original, arquivo pessoal).

Figura 2: Fluxograma representativo das etapas envolvidas nos processos de conservação da água de coco.

Figura 3: Lavagem da superfície externa do coco antes da abertura e processamento (adaptado de <https://www.cocolegal.com.br/>).

Figura 4: Embalamento mecânico e asséptico das garrafas de água de coco. (adaptado de <https://www.cocolegal.com.br/>).

Figura 5: Embalagem isotérmica utilizada no transporte das amostras para o laboratório (original, arquivo pessoal).

Figura 6: Amostra congelada logo após receção (original, arquivo pessoal).

Figura 7: Preparação para diluição inicial da amostra de água de coco (original, arquivo pessoal).

Figura 8: Meio de cultura utilizado no enriquecimento seletivo de *Salmonella* spp.: caldo de Rappaport-Vassilidis e caldo de Tetrationato; tubos da esquerda: inoculados sem desenvolvimento bacteriano; tubos da direita: inoculados com evidência de desenvolvimento bacteriano, por mudança de cor e turvação do meio de cultura (original, arquivo pessoal).

Figura 9: Placas do meio VRB após incubação, com presença de colónias típicas (original, arquivo pessoal).

## **Índice de Gráficos**

Gráfico 1: Média das contagens de coliformes totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a ultracongelação a  $-30^{\circ}\text{C}$  com (azul) e sem (vermelho) o uso de ultravioleta.

Gráfico 2: Média das contagens de mesófilos totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a ultracongelação a  $-30^{\circ}\text{C}$  com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.

Gráfico 4: Média das contagens de coliformes totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a refrigeração a  $0-5^{\circ}\text{C}$  com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.

Gráfico 3: Média da contagem de bolores e leveduras (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a ultracongelação a  $-30^{\circ}\text{C}$  com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.

Gráfico 5: Média das contagens de mesófilos totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a refrigeração a  $0-5^{\circ}\text{C}$  com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.

Gráfico 6: Média das contagens de bolores e leveduras (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a refrigeração a  $0-5^{\circ}\text{C}$  com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.

## **Índice de tabelas**

Tabela 1: Características da luz ultravioleta (adaptado de Guerrero-Beltran and Barbosa-Cánovas 2004).

Tabela 2: Identificação das amostras de água de coco do lote NI01 considerando o uso de tratamento ultravioleta e arrefecimento aplicado.

Tabela 3: Identificação das amostras de água de coco do lote 295 considerando o uso de tratamento ultravioleta e congelação aplicado.

Tabela 4: Identificação das amostras de água de coco do lote 338 considerando o uso de tratamento ultravioleta e tratamento térmico aplicado.

Tabela 5: Resultados da pesquisa e quantificação de *E. coli* em amostras enviadas para controlo de qualidade industrial, expressos em log ufc/ml.

Tabela 6: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 1 no dia 1 após fabrico, expressos em log ufc/ml.

Tabela 7: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 1 no dia 15 após fabrico, expressos em log ufc/ml.

Tabela 8: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 2 no dia 1, 10 e 15 após fabrico, expressos em log ufc/ml.

Tabela 9: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 3 nos dias 1, 10 e 15 após fabrico, expressos em log ufc/ml.

Tabela 10: Resultados obtidos no dia 1 após fabrico das amostras NI01a, 295a, 338a, NI01c e 295b, expressos em log ufc/ml.

Tabela 11: Resultados microbiológicos obtidos no dia 10 após fabrico das amostras 295a, 338a e 295b, expressos em log ufc/ml.

Tabela 12: Resultados microbiológicos obtidos no dia 15 após fabrico das amostras NI01a, 295a, 338a, NI01c e 295b, expressos em log ufc/ml.

Tabela 13: Resultados obtidos no dia 1 após fabrico das amostras NI01b, 338b e NI01d, expressos em log ufc/ml.

Tabela 14: Resultado obtido no dia 10 após fabrico da amostra 338b, expressos em log ufc/ml.

Tabela 15: Resultados obtidos no dia 15 após fabrico das amostras NI01b, 338b e NI01, expressos em log ufc/ml.

## **Índice de abreviaturas**

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

APHA – ANIMAL AND PLANT HEALTH AGENCY

AND - ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

ARN – ÁCIDO RIBONUCLEICO

BPLS - AGAR VERDE BRILHANTE VERMELHO DE FENOL DE LACTOSE DE SACAROSE MODIFICADO

DRBC – AGAR ROSA BENGALA

EMB – AGAR EOSINA AZUL-DE-METILENO

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION

LIA - AGAR LISINA FERRO

NM - NANÔMETRO

PCA - AGAR PADRÃO PARA CONTAGEM

RDC - RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA

RV – MEIO RAPPAPORT-VASILADIS

TSI – AGAR TRIPLE SUGAR IRON

TT – MEIO TETRATONATO

UFC/G - UNIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÓNIAS / GRAMA

UFC/ML – UNIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÓNIAS / MILILITRO

UHT - ULTRA HIGH TEMPERATURE

UV – ULTRAVIOLETA

VRB - VIOLET RED BILE AGAR

XLD - XILOSE LISINA DESOXICOLATO

°C – GRAUS CELSIUS



## 1. Introdução

A água de coco é um alimento natural existente na cavidade da semente do coco, rico em nutrientes, tendo como composição 93% de água, 5% de açúcares, e proteínas, vitaminas e sais minerais em proporções variáveis (Assis et al. 2000). A água de coco é utilizada na cultura popular como substituto da água e também para repor eletrólitos em caso de desidratação (Aragão et al. 2002).

Além das características nutricionais, por ser um alimento refrescante e de baixo teor calórico, análises de mercado revelam um aumento significativo não apenas da cultura, mas da oferta e comercialização da água de coco no Brasil (Carrijo 2002). Contudo, a comercialização da água de coco “*in natura*”, extraída do fruto e sem processamento tecnológico, envolve problemas relacionados com transporte, armazenamento e a perecibilidade do produto (Hoffman et al. 2002).

Tradicionalmente, a água de coco é comercializada dentro do próprio fruto, e embora seja estéril, enquanto no interior do fruto, a sua composição rica em nutrientes propicia o desenvolvimento microbiano, propiciando complicações relacionadas com a conservação do produto logo após a abertura (Aragão 2002).

A fim de permitir o seu consumo em locais fora das regiões produtoras torna-se fundamental a sua industrialização, visando diminuir o volume e o peso transportados e, consequentemente reduzir os custos de transporte, bem como aumentar a sua vida útil (Oliveira et al. 2003; Rosa and Abreu 2000).

O mercado atual de água de coco é bastante amplo e o aumento da escala produtiva do produto embalado passou a ser uma tendência, estimulando o desenvolvimento de processos que permitam aumentar sua vida útil com custos e exigências compatíveis com o mercado consumidor. Essa é uma tendência natural do setor agroindustrial, que vem registrando um aumento da procura por técnicas e/ou processos visando a conservação de produtos perecíveis (Rosa and Abreu 2000).

Em relação à água de coco “*in natura*”, novas alternativas de mercado têm surgido nos últimos anos, contribuindo para aumentar o consumo do produto. Uma delas foi a introdução de máquinas de extração de água de coco, chamada de “Coco Express”, com o produto servido diretamente ao consumidor (Saabor et al. 2000).

Durante a produção industrial de água de coco, apesar da higienização prévia, o coco e o seu produto passam por manipulações e exposições ao ambiente industrial excessivas, o que salienta a importância deste estudo de avaliação da qualidade microbiológica de amostras de água de coco. Diversos métodos de preservação vêm sendo

estudados, como por exemplo a esterilização térmica, filtração, pasteurização, adição de conservantes, e em alguns casos, combinações de métodos para preservação (Abreu and Souza 2017).

Os principais microrganismos contaminantes da água de coco estão relacionados com a produção, manipulação e utensílios envolvidos na produção e comercialização da água de coco “*in natura*”. Destes destacam-se os coliformes totais e os coliformes termotolerantes *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Fortes et al. 2006).

Os coliformes totais (35°C) são indicadores do nível de contaminação ambiental que o alimento agregou durante o processamento (Franco and Langraf 2003). Os coliformes termotolerantes (45°C) são utilizados como indicadores de contaminação fecal, destacando-se neste grupo *E. coli*, considerada indicadora de contaminação fecal direta ou indireta (Dias et al. 2015). O gênero *Salmonella* spp., além de ser considerado um importante indicador da qualidade higiossanitária dos alimentos, é também considerado um dos principais causadores de infecção de origem alimentar (Franco and Langraf 2003).

O processamento térmico é usado como forma efetiva de conservação e preservação de alimentos. Entretanto, em alguns casos, o uso do calor pode afetar o produto final de forma negativa, levando a alterações sensoriais e físico-químicas do produto.

Alguns processos não térmicos vêm sendo aplicados para a preservação de alimentos sem causar os efeitos adversos do uso do calor. Um desses processos é o tratamento de alimentos com luz ultravioleta de ondas curtas (UV-C), que tem sido bastante estudada pela sua eficiência na inativação microbiológica em águas e também na superfície de diversos materiais (Guedes et al. 2009).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil) através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 12, de 02 de janeiro de 2001 dispõe sobre os padrões microbiológicos para a água de coco, sendo estabelecidos valores de referência para coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. Recentemente, foi publicada a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, com alterações no padrão microbiológico estabelecido para os alimentos. Substituindo a quantificação de coliformes a 45°C/ml, obrigatória de acordo com a Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001, pela pesquisa e quantificação apenas da espécie *E. coli* nos produtos alimentares prontos para consumo. A nova Instrução Normativa entrará em vigor a partir de janeiro de 2021.



## **2. Objetivo**

Este trabalho tem por objetivo a avaliação microbiológica de água de coco processada industrialmente, comparando amostras que passaram pelo tratamento ultravioleta associado ao arrefecimento - refrigeração ou congelação, e amostras que não foram submetidas a tratamento ultravioleta.

### **3. Revisão bibliográfica**

#### **3.1. Avaliação microbiológica dos alimentos**

A análise microbiológica de alimentos é uma forma objetiva de verificação da salubridade dos alimentos, sendo também utilizada para garantir a sua qualidade comercial. Nem sempre a presença de microrganismos nos alimentos significa um perigo para a saúde do consumidor, pelo que é de suma importância determinar que microrganismos estão presentes e em que quantidade. Todavia, certos microrganismos podem ser utilizados como indicadores de contaminação e de falha nas práticas de higiene e sanitização durante os processos de produção, manipulação, transporte e armazenamento dos alimentos (Forsythe 2002; Santos et al. 2019).

A evolução da microbiota é fundamental na determinação do período previsto de consumo dos alimentos antes de sua deterioração, sendo um dos aspetos mais importantes para a determinação do prazo de validade dos produtos (Perera et al. 2010). Entre as determinações microbiológicas mais relevantes para avaliar a qualidade microbiológica do alimento, estão a pesquisa de *Salmonella* spp., e a quantificação de coliformes totais, de coliformes termotolerantes e de bolores e leveduras (Silva et al. 2017).

As contagens de coliformes são muito utilizadas nas análises de alimentos tratados termicamente. Nesse contexto, a presença de bactérias Gram-negativas, por exemplo, indicia tratamentos térmicos inadequados ou uma provável contaminação após processamento (Sousa 2006).

A análise dos microrganismos indicadores de contaminação higiossanitária é geralmente usada para monitorizar, detetar mudanças de qualidade, classificar, ou restringir o uso de águas ou de alimentos. Os maiores riscos para a saúde estão associados ao consumo de água e/ou de alimentos contaminados por agentes patogénicos. O principal objetivo da utilização de bactérias como indicador higiossanitário é revelar defeitos no tratamento e/ou na manipulação, que se podem traduzir num perigo potencial para a saúde do consumidor (APHA 1998).

As contagens de bactérias em número elevado aumentam a probabilidade de alterações sensoriais no alimento em questão. Assim, a análise microbiológica de mesófilos nos alimentos é um parâmetro utilizado para avaliar as condições em que estes foram produzidos e os riscos que esses podem gerar aos consumidores, além de se verificar o cumprimento de normas e leis relacionadas à produção, transporte e armazenamento de alimentos e se estes alcançarão a vida útil pretendida pelo fabricante (Steele 2004; Silva et al. 2017).

O grupo dos coliformes totais inclui bastonetes Gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, com capacidade de fermentar a lactose produzindo gás, em 24 a 48 horas a 35°C. O grupo dos coliformes termotolerantes tem a mesma definição dos coliformes totais, porém restringe-se a bactérias capazes de fermentar a lactose produzindo gás em 24 horas a 44,5 - 45,5°C. As bactérias pertencentes a esses grupos são da família Enterobacteriaceae, predominantemente, bactérias dos gêneros *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Klebsiella* spp., sendo encontradas nas fezes, vegetação e no solo, com exceção apenas de *E. coli*, presente apenas no trato intestinal do homem e animais homeotérmicos (Cardoso et al. 2001).

Os fungos estão amplamente distribuídos no ambiente, como água, ar, solo e matéria orgânica em decomposição, e incluem os bolores e as leveduras. Os bolores são fungos filamentosos (hifas) e multicelulares, enquanto as leveduras são unicelulares (Brito and Rossi 2005). Esses microrganismos são usualmente utilizados em técnicas de produção de alimentos, mas também são responsáveis pela deterioração de alguns alimentos. A sua ocorrência é maior em alimentos ácidos, com baixa atividade de água e com elevado teor em lípidos (Messa et al. 2019).

A multiplicação celular dos fungos é geralmente mais lenta que a das bactérias. A sua presença em alimentos, no entanto, indica má conduta de manipulação, higiene ineficaz de equipamentos e falha no processamento e/ou armazenamento da matéria-prima (Viana et al. 2019).

### **3.2. Análises microbiológicas da água de coco “*in natura*”**

Foram encontrados diversos estudos analisando a qualidade microbiológica da água de coco vendida em regime ambulante, ou água de coco extraída e engarrafada vendida em supermercados, porém não foram encontrados dados publicados de estudos realizados dentro da indústria de processamento de água de coco. Em estudos como o de Jesus et al. (2018) e Dias et al. (2014), foram recolhidas amostras de água de coco vendidas em carrinhos de ambulantes, prática muito comum no Brasil.



**Figura 1: Venda ambulante de água de coco - Rio de Janeiro, Brasil (original, arquivo pessoal).**

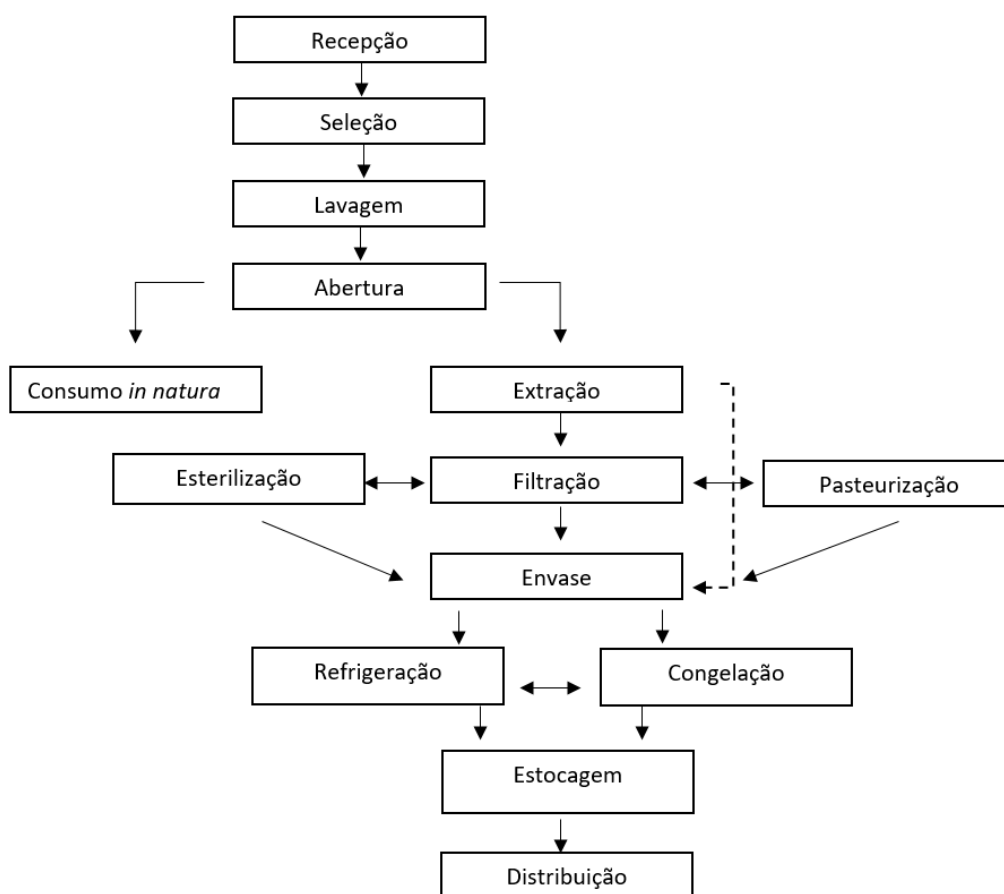
Os resultados obtidos no estudo realizado por Jesus et al. (2018), indicaram que das 12 águas de coco analisadas, 12 (100%) foram positivas para coliformes totais e termotolerantes. No estudo realizado por Dias et al. (2014) a avaliação das amostras revelou que das 15 amostras de água de coco, 13 (86,7%) apresentaram bactérias coliformes em teor igual ou superior a  $10^2$  ufc/ml, enquanto 2 amostras (13,3%) apresentaram valores inferiores. Quanto à pesquisa de coliformes termotolerantes, das 13 amostras contaminadas com coliformes totais, 11 (84,7%) apresentaram coliformes termotolerantes, tendo sido detetada a presença de *Klebsiella* spp. em 6 amostras (54,5%) e *E. coli* nas restantes amostras (45,5%).

Acredita-se que a realidade para a água de coco de origem industrial, na maior parte dos casos, é diferente, dada a implementação de protocolos de boas práticas de fabrico e higiene, além da necessidade de controlo da qualidade microbiológica dos lotes para cumprimento das regras higio-sanitárias, seguindo os protocolos impostos por decretos e instruções normativas, mantendo assim a qualidade e segurança do alimento a ser comercializado.

### 3.3. Tipos de consumo e tratamento empregados na conservação da água de coco

A água de coco verde pode ser consumida na forma “*in natura*” dentro do próprio fruto, ou extraída, bem como processada, e sua vida útil dependerá dos métodos de conservação aplicados. Os métodos de processamento visam, essencialmente, inibir a ação enzimática e garantir a estabilidade microbiológica da água de coco após a abertura do fruto, mantendo tanto quanto possível as suas características sensoriais originais (Rosa and Abreu 2000). Existem diversos métodos de processamento da água de coco verde que visam a prevenção ou redução do desenvolvimento microbiano, entre elas a pasteurização, a esterilização, a filtração e o tratamento por raios ultravioletas (David and Fernandez 1998; Costa et al. 2005).

A Figura 2 apresenta um fluxograma considerando as etapas envolvidas na produção de água de coco, incluindo tratamentos de conservação possíveis para o produto. A sequência de algumas etapas pode, em alguns casos, ser alterada, sem impacto no produto final. Além disso, pode ocorrer a associação de um ou mais métodos de conservação, de acordo com protocolos industriais específicos.



**Figura 2: Fluxograma representativo das etapas envolvidas nos processos de conservação da água de coco.**

### 3.3.1. Água de coco verde “*in natura*”

O consumo do coco verde “*in natura*” é bastante representativo, principalmente, nas regiões litorais do Brasil. A água de coco sofre mudanças na sua composição de acordo com o grau de maturação e desenvolvimento do fruto. Além do grau de maturação, outros fatores como a variedade do fruto, a região de origem e a época do ano também influenciam nas características físico-químicas e sensoriais do produto (Silva et al. 2020).

Após a colheita, o fruto deve ser armazenado em local fresco e seco, podendo ser consumido dentro de um período máximo de 10 dias, após o qual se iniciam processos de deterioração que comprometem, principalmente, a acidez do líquido (Aroucha et al. 2014).

### 3.3.2. Prevenção do desenvolvimento bacteriano

A água no interior do fruto é estéril e assim se mantém desde que o fruto não sofra nenhuma lesão que possibilite a entrada de microrganismos (Santos et al. 2013). Contudo, durante o processamento, após a abertura do fruto podem ocorrer contaminações microbiológicas e alterações bioquímicas que prejudiquem a qualidade microbiológica e sensorial do produto, impossibilitando a sua comercialização. O ideal é que antes da abertura do fruto, este seja devidamente higienizado.



**Figura 3: Lavagem da superfície externa do coco antes da abertura e processamento** (adaptado de <https://www.cocolegal.com.br/>).

Os processos tecnológicos que visam a prevenção do desenvolvimento bacteriano na água de coco incluem lavagem do fruto, embalagem asséptica, refrigeração ou congelação da água de coco.

#### 3.3.2.1. Embalagem

A água de coco embalada deve ser obtida a partir de processo tecnológico adequado, preservando tanto quanto possível suas características naturais. A abertura do

fruto e embalagem em garrafas pode ser feito de forma manual ou através de máquinas automatizadas. Esta etapa deve ser realizada no menor tempo possível, diminuindo ao máximo a exposição do produto ao ambiente e contato com ar, que faz com que o produto oxide e fermente, apresentando o sabor alterado (Prades et al. 2012; Souza and Souza 2019).

A abertura e embalagem manual da água de coco apresentam maiores obstáculos em termos higiossanitários do que a forma automatizada, visto que tanto a manipulação quanto o tempo entre a abertura do fruto e embalagem são maiores (Cabral et al. 2005).

A água de coco é geralmente comercializada em garrafas plásticas do tipo “PET” (polietileno-tereftalato), podendo também ser embalada em copo com tampa termo-soldável ou garrafas de polietileno de baixa densidade (PEBD) (Figueiroa and Oliveira 2017).

As boas práticas de fabrico devem ser rigorosamente seguidas e monitorizadas para garantir a qualidade sob o ponto de vista higiossanitário do alimento, e a segurança do consumidor.

As garrafas de água de coco da empresa analisada recebem cuidados especiais. Por exemplo: a garrafa é esterilizada com água ozonizada antes de receber a água de coco. O embalagem é feito imediatamente após a extração, para garantir a qualidade e pureza do produto.



**Figura 4:** Embalamento mecânico e asséptico das garrafas de água de coco (adaptado de <https://www.cocolegal.com.br/>).

### **3.3.2.2. Arrefecimento**

O arrefecimento imediato da água de coco após embalagem visa a prevenção da multiplicação microbiana. O produto deve ser arrefecido o mais rápido possível a temperaturas de 5°C a 8°C (Cabral et al. 2005).

A validade comercial do produto é de cerca de três dias. Após este período, pode ocorrer aumento da carga microbiana e aumento de reações bioquímicas, com a consequente alteração de cor, sabor e odor, tornando o produto impróprio para consumo (Costa et al. 2005; Jesus et al. 2018).

### **3.3.2.3. Congelação**

A congelação é o processo no qual as temperaturas dos alimentos são reduzidas muito rapidamente fazendo com a água livre presente nos alimentos passe para o estado sólido, de modo a que não danifique o alimento, tendo em conta as suas características em termos organoléticos (Pinto and Neves 2010). A etapa de congelação pode ser conduzida sob diversas formas, de acordo com a escala de produção, e deve ser realizada no menor intervalo de tempo possível, a fim de preservar as características originais do produto (Amaral et al. 2012; Prades et al. 2012).

Na congelação lenta, a formação dos cristais ocorre gradativamente promovendo o que se conhece como crioconcentração. Nesse caso, a congelação não é uniforme ao longo da embalagem e os açúcares e os sais concentram-se na última parte a ser congelada. A etapa de congelação ocorre em câmaras frigoríficas, em períodos de 8 a 12 horas, com temperaturas em torno de  $-18^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ . É recomendável o uso de ventilação forçada no interior das câmaras frias para aumentar a eficiência de troca térmica (Rosa and Abreu 2000).

A água de coco congelada é geralmente comercializada em garrafas plásticas. Neste ponto, cabe salientar que alguns materiais de embalagem, tais como o PVC e o nylon, são incompatíveis com a congelação, podendo sofrer rachaduras ou tornarem-se quebradiços (Rosa and Abreu 2000).

### **3.3.2.4. Ultracongelação**

A ultracongelação é um processo que apresenta características semelhantes ao processo de congelação, uma vez que também existe uma redução rápida da temperatura como método para conservação dos alimentos. A ultracongelação é um processo mais rápido no que se refere à cristalização, permitindo assim que sejam formados cristais de gelo de tamanho muito mais pequenos e em número reduzido, não afetando por isso a estrutura das células como já referido e explicado anteriormente (Pereira 2011).

Neste processo existe uma congelação muito rápida, onde inicialmente o produto é submetido a temperaturas muito baixas (entre  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $-50^{\circ}\text{C}$ ), durante um período reduzido de tempo, normalmente durante 30 minutos. Posteriormente a temperatura é estabilizada no valor de  $-18^{\circ}\text{C}$ , sendo esta a temperatura a que os alimentos deverão ser mantidos durante o seu armazenamento, segundo Pinto and Neves (2010).



Em termos de técnicas para o processo de ultracongelamento, segundo Pinto and Neves (2010), existe o processo por contacto (em congeladores de placas), ao ar (túneis de congelamento) e por imersão (por gases liquefeitos).

### **3.3.3. Redução da carga microbiana**

Alguns métodos de tratamento de alimentos visam a redução da carga microbiana do produto, levando a inativação ou destruição de bactérias, vírus, esporos e quistos. A redução da carga microbiana permite aumentar a vida útil do produto (Steele 2004).

#### **3.3.3.1. Pasteurização**

A pasteurização consiste na redução microbiana através do uso de calor. O binómio tempo - temperatura deve rondar os 90°C a 95°C por 60 segundos, para que haja a diminuição da carga microbiana sem mudanças significativas das características sensoriais (Rosa and Abreu 2000, Abreu and Souza 2017).

A pasteurização é executada em equipamentos do tipo permutadores de calor em placas dotados de sistema de aquecimento/ arrefecimento (Prades et al. 2012).

O tratamento térmico permite, em média, estabilidade comercial de 30 dias da água de coco sem conservantes e sob refrigeração a 4°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), que é estabelecida como temperatura de referência para conservação de alimentos refrigerados à escala comercial (Silva et al. 2003; Pinto 2017).

A água de coco termicamente processada por pasteurização deve seguir rigorosamente as condições de armazenamento sob o risco de não suportar, em relação ao aspeto microbiológico, o tempo de armazenamento estabelecido (Abreu and Souza 2017).

#### **3.3.3.2. Esterilização / UHT**

O processo *ultra high temperature* (UHT) garante uma condição de esterilidade comercial, possibilitando o armazenamento do produto à temperatura ambiente (Prades et al. 2012). O sistema compreende dois estágios: uma pasteurização prévia e a esterilização propriamente dita. Na etapa de esterilização, o produto é submetido a temperaturas de cerca de 135°C durante 4 segundos e é arrefecido em seguida a 25°C, ficando comercialmente estéril. Apesar de o tempo de esterilização ser de apenas poucos segundos, há efeitos deletérios sobre as características de sabor e aroma. Este aspeto vem sendo otimizado pelas indústrias do setor (Sucupira 2016).

#### **3.3.3.3. Filtração**

Os processos de filtração com membranas destacam-se como alternativas aos processos convencionais de tratamento térmico. A membrana age como uma barreira permeável seletiva para separar um ou mais solutos de um fluido (Magalhães et al. 2005). Esses processos usam baixa temperatura minimizando danos térmicos, preservando o valor

nutricional e sensorial, e contribuindo para a manutenção das características originais do produto (Carvalho et al. 2006).

A membrana age como peneira molecular. A carga microbiana presente na água de coco pode ser reduzida de forma significativa, ou até mesmo eliminada, pois os microrganismos são maiores do que os poros de determinadas membranas. Dependendo das características da membrana selecionada para o processamento, também as enzimas, que são macromoléculas, podem ser retidas. Por outro lado, os açúcares e sais minerais, importantes na qualidade sensorial e presentes na composição da água de coco, permeiam através da membrana, pois apresentam tamanho menor do que o dos poros das membranas de ultrafiltração (Aragão et al. 2002; Sousa 2006).

No processamento de água de coco por ultrafiltração, obtêm-se um produto límpido, estéril e sem atividade enzimática. Esta tecnologia permite cumprir padrões rigorosamente definidos, melhorando a qualidade e segurança dos alimentos (Petrus 2000).

#### **3.3.3.4. Uso de radiações ultravioletas em alimentos**

O uso do tratamento ultravioleta de alimentos a partir de ondas curtas (UV-C) tem sido bastante estudado pela eficiência na inativação microbiológica em água e superfícies de diversos materiais (López-Malo and Palou 2004; Guedes et al. 2009).

A radiação ultravioleta exerce efeitos biológicos e bioquímicos, com diversas aplicações no processamento de alimentos. A sua primeira aplicação ocorreu no tratamento de água e estendeu-se aos sumos, após aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América (Guedes et al. 2009)

Normalmente, o comprimento de onda utilizado para processamento de alimentos por radiação ultravioleta varia entre 100 e 400 nm. Este intervalo pode ser subdividido em UV-A (315-400 nm) e UV-B (280-315 nm) e UV-V de vácuo (100-200 nm) com ações variadas, porém é a faixa UV-C (200-280 nm), denominada faixa germicida, que efetivamente inativa bactérias e vírus (Koutchma 2009; Choudhary et al. 2012) (tabela 1).

**Tabela 1: Características da luz ultravioleta (adaptado de Guerrero-Beltran and Barbosa-Cánovas 2004).**

Tipo de radiação UV	Comprimento de onda	Característica
UV-C	200-280	Capacidade germicida
UV-V	100-200	UV de vácuo

O tratamento com radiação ultravioleta a seco e a frio é simples e eficaz. Pode ser considerado de baixo custo, como indicado por Guerrero-Beltran and Barbosa-Cánovas (2004), quando comparado com outros métodos de esterilização. No entanto, a principal

limitação dessa tecnologia envolve o baixo grau de penetração que dificulta o alcance da radiação por toda a carga microbiana existente no alimento. Por isto, é mais utilizado em esterilização de superfícies como, por exemplo, em embalagens para alimentos (Marquis and Baldeck, 2007) e em filmes comestíveis. Em líquidos, recomenda-se o fluxo turbulento durante o processamento (Guedes et al. 2009).

As lâmpadas mais comumente utilizadas para este tratamento são as de baixa pressão, que emitem essencialmente radiação monocromática a um comprimento de onda de cerca de 254 nm. Este tipo de lâmpada possui um tubo de quartzo e dois filamentos de tungstênio e contém 60mg de mercúrio a 10Torr (unidade de pressão), aproximadamente. As lâmpadas de pressão média têm uma saída espectral que vai desde os 200 nm até comprimentos de onda de quase 600 nm, o que resulta numa série de emissões na região ultravioleta e no intervalo do visível. Estas contêm cerca de 300mg de mercúrio a 1000Torr, e operam a elevadas temperaturas, de forma que a superfície da lâmpada pode alcançar os 800°C, implicando por isso um elevado consumo de energia (Koutchma 2009).

Um fator importante a considerar na escolha do tipo de lâmpada é a sua eficiência germicida. As lâmpadas de baixa pressão apresentam o dobro da eficiência das lâmpadas de pressão média e um menor consumo de energia ao serem utilizadas (Bolton and Cotton 2008). Oliveira and Anjos (2012) reforçaram esta ideia através do seu estudo, onde verificaram uma redução microbiana significativa no tratamento ultravioleta com o uso das lâmpadas de baixa pressão.

O uso de ultravioleta tem sido utilizado com sucesso por muitos anos para a descontaminação de água potável (Templeton et al. 2006; Bolton et al. 2010). Para outros líquidos, tais como sucos de frutas, um dos principais fatores limitantes para a eficiência do tratamento com ultravioleta é a profundidade de penetração reduzida como resultado da presença de solutos e partículas (Wright et al. 2000).

#### **3.3.3.5. Inativação dos microrganismos pela radiação ultravioleta**

É fundamental fazer-se a distinção entre a inativação e a morte de microrganismos. No caso de desinfetantes químicos, como o cloro e o dióxido de cloro, inativar e/ou matar podem ser considerados sinónimos, uma vez que estes produtos danificam e destroem as estruturas celulares dos microrganismos, o que interfere no seu metabolismo, na sua biossíntese e na sua multiplicação. De maneira oposta, a radiação ultravioleta, não destrói nem danifica as suas estruturas celulares, apenas impede a sua reprodução. Os ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN), representam os constituintes celulares alvos para a inativação pela radiação ultravioleta, na maioria dos

microrganismos (Bolton, 2000). É sabido que microrganismos que não se podem reproduzir também não podem infectar, logo não seriam capazes de causar doença (Koutchma 2009).

Ainda que todos os comprimentos de onda ultravioleta causem efeitos fotoquímicos, os comprimentos de onda na faixa UVC (200-280 nm), conhecida como faixa germicida, são particularmente prejudiciais às células, afetando bactérias, vírus e outros agentes patogénicos. A maior eficiência em termos germicidas é obtida com radiação entre 250 e 270 nm, mas pode diminuir à medida que o comprimento de onda aumenta (Guerrero-Beltrán and Barbosa Cánovas 2004; Kowalsky 2009; Kneissl and Rass 2016).

Avanços recentes na ciência e na engenharia da radiação ultravioleta demonstraram que esta é uma promessa considerável no processamento de alimentos como alternativa ao tratamento térmico tradicional para alimentos líquidos (Koutchma 2009).

#### **3.3.3.6. Uso do ultravioleta para preservação de alimentos**

A deterioração de alimentos por microrganismos é causa de perdas para as indústrias, pois determina a vida comercial de um produto, além de representar um risco para o consumidor (McDonald and Sun 2008).

É importante identificar os principais deteriorantes de cada alimento, bem como os processos que visem a sua inativação ou dificultem o seu desenvolvimento.

O tratamento ultravioleta é uma promissora alternativa aos tratamentos mencionados anteriormente, como a pasteurização, o tratamento UHT, e a filtração, visto ser de fácil aplicação e sem efeitos prejudiciais para o meio ambiente ou para o consumidor (Barbosa-Cánovas et al 1998; Manzocco et al 2016).

A aplicação de UV-C como uma técnica não térmica para prolongar a vida útil de alimentos é comumente utilizada para a conservação de bebidas, sucos e frutas (Gómez et al. 2010; Ukuku and Geveke 2010; Gabriel 2012; Syamaladevi et al. 2013; Müller et al. 2015; Tremarin et al. 2016; Braga 2018).

Uma vez que o tratamento é superficial, é necessário o conhecimento do alimento a ser tratado com ultravioletas.

### **4. Material e métodos**

#### **4.1. Protocolo para o estudo**

Tendo em vista a realização deste estudo, foram enviadas amostras de água de coco de origem industrial para serem analisadas microbiologicamente na empresa BQ.

Foram feitas análises microbiológicas a 91 amostras para controlo de qualidade interno da empresa, entre os meses de outubro de 2019 e março de 2020. As análises foram feitas de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada nº 12, de 02 de janeiro de

2001, que determina os padrões microbiológicos para alimentos e estipula a quantificação de bactérias coliformes totais e termotolerantes em 1ml e diluições seriadas, e a pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 ml de amostras de água de coco.

Foi desenvolvido pela empresa produtora de água de coco um projeto piloto para validação do tratamento de amostras congeladas e/ou refrigeradas com radiação ultravioleta. Além da quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 ml, foi realizada a contagem de bolores e leveduras e de mesófilos totais em 1ml e diluições seriadas de amostras de água de coco, de acordo com a Instrução Normativa nº 27, de 22 de julho de 2009 que estabelece os procedimentos mínimos de controlo higiossanitário, padrões de identidade e características mínimas de qualidade gerais para a água de coco. O processo de validação foi desenvolvido pela indústria de água de coco, sendo enviado apenas para análise microbiológica na empresa BQ.

#### **4.2. Recolha das amostras**

As amostras foram recolhidas no final da linha de embalagem por funcionários da empresa produtora, de acordo com a amostragem definida. As garrafas de água de coco (produto final) foram colocadas num recipiente isotérmico e enviadas para o laboratório BQ de modo a chegarem ainda congeladas para análise microbiológica. As amostras eram recebidas e registradas para serem analisadas (figura 5 e 6).



**Figura 5: Embalagem isotérmica utilizada no transporte das amostras para o laboratório (original, arquivo pessoal).**



**Figura 6: Amostra congelada logo após receção (original, arquivo pessoal).**

#### **4.3. Pesagem e preparação da amostra em geral**

Antes do início do procedimento de diluição, as amostras a serem analisadas foram homogeneizadas, de forma que qualquer alíquota fosse capaz de representar a amostra como um todo. Para diluição, as amostras foram descongeladas em refrigeração. Para a descongelação das amostras, estas foram mantidas a 0-5°C durante aproximadamente 12 horas antes de serem homogeneizadas e analisadas.

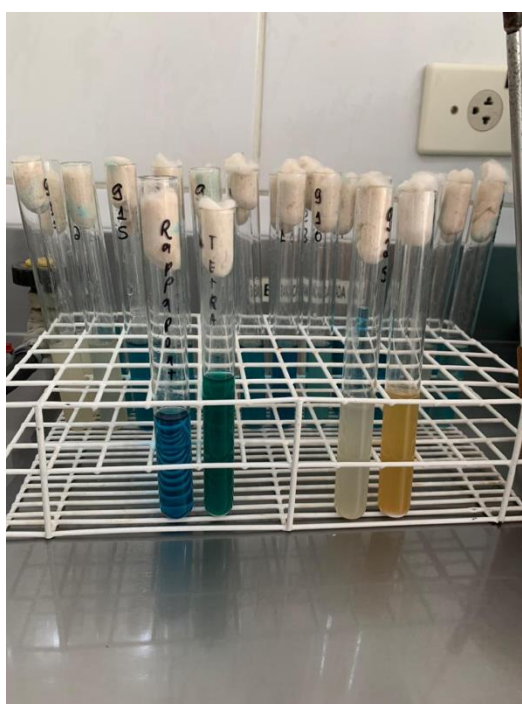
Numa solução de 225 ml de água peptonada tamponada 0,1% pipetaram-se  $25 \pm 0,2$  ml da amostra, conforme recomendação da ISO 6887-5:2010. A amostra foi homogeneizada por aproximadamente 60 segundos em stomacher, seguindo-se a aplicação da técnica das diluições decimais.



**Figura 7: Preparação para diluição inicial da amostra de água de coco (original, arquivo pessoal).**

#### 4.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A técnica utilizada para pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 ml foi a descrita na ISO 6759:2002, que considera as seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento diferencial, confirmação preliminar e sorologia. Para o pré-enriquecimento, uma alíquota de 25 ml da amostra foi diluída em 225 ml de água peptonada tamponada. As amostras foram incubadas em estufa a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas. Seguiu-se a etapa do enriquecimento seletivo, que consistiu em semear alíquotas de 0,1 ml da cultura pré-enriquecida em tubos tubo com 10 ml de caldo Rappaport-Vasiliadis (RV) seguindo-se incubação a  $41\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2$  horas e 1 ml em tubos com 10 ml de caldo Tetratonato (TT) seguindo-se incubação a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 2$  horas (figura 8).



**Figura 8: Meio de cultura utilizado no enriquecimento seletivo de *Salmonella* spp.: caldo de Rappaport-Vassilidis e caldo de Tetratonato; tubos da esquerda: inoculados sem desenvolvimento bacteriano; tubos da direita: inoculados com evidência de desenvolvimento bacteriano, por mudança de cor e turvação do meio de cultura (original, arquivo pessoal).**

De cada tubo do enriquecimento seletivo, apresentando evidência de desenvolvimento bacteriano (turvação do meio e mudança de cor) ou não, foi retirada uma alíquota para esgotamento em placa com agar verde brilhante (BPLS) e outra para isolamento em placa com agar xilose lisina desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas em estufa a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm 3$  horas. Em BPLS as colônias típicas são incolores ou de coloração rosada, translúcidas a ligeiramente opacas. Quando há presença de microrganismos fermentadores de lactose, podem apresentar coloração verde-amarelada. Em XLD as colônias típicas são arredondadas, vermelhas ou vermelhas com centro negro. Para confirmação preliminar, com o auxílio de uma agulha de inoculação foi retirada uma

colônia característica, a qual é inoculada em tubo contendo agar lisina ferro (LIA) inclinado e outra colônia característica foi retirada e inoculada em tubo contendo agar *triple sugar iron*, TSI (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, França) inclinado. Ambos foram incubados em estufa a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e os resultados analisados de acordo com o descrito na tabela 2. Para os tubos com reações sugestivas da presença de *Salmonella* spp. foi recolhida uma colônia para prosseguir com os testes confirmatórios e sorológicos.

#### **4.4.1. Testes Confirmatórios**

##### **4.4.1.1. Teste do indol**

Com uma ansa, transferiu-se uma alíquota contendo cultura do tubo de TSI com reação positiva para um novo tubo contendo 10 ml de água peptonada tamponada 0,1%, o qual foi incubado a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado 0,3 ml de reagente de Kovac's (Merck, Darmstadt, Alemanha) e observou-se se ocorria formação de um anel vermelho na superfície, o que seria indicativo de resultado positivo para o teste do indol.

##### **4.4.1.2. Teste sorológico**

A partir de uma cultura com 24 horas em TSI, com uma ansa transferiu-se cultura para uma lâmina de vidro, e adicionou-se uma gota de solução salina fisiológica estéril e para outra lâmina, adicionando 1 gota de soro polivalente anti-*Salmonella* "O" (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Sob fundo escuro, observa-se a presença de aglutinação na mistura da colônia com o anti-soro.

Os resultados dos testes confirmatórios foram analisados e registados sendo considerada uma reação característica de *Salmonella* spp. um resultado negativo para o teste do indol e positivo para o soro polivalente anti-*Salmonella* "O". Os resultados foram expressos em "Ausência/25ml" ou "Presença/25ml".

#### **4.5. Contagem de Coliformes totais**

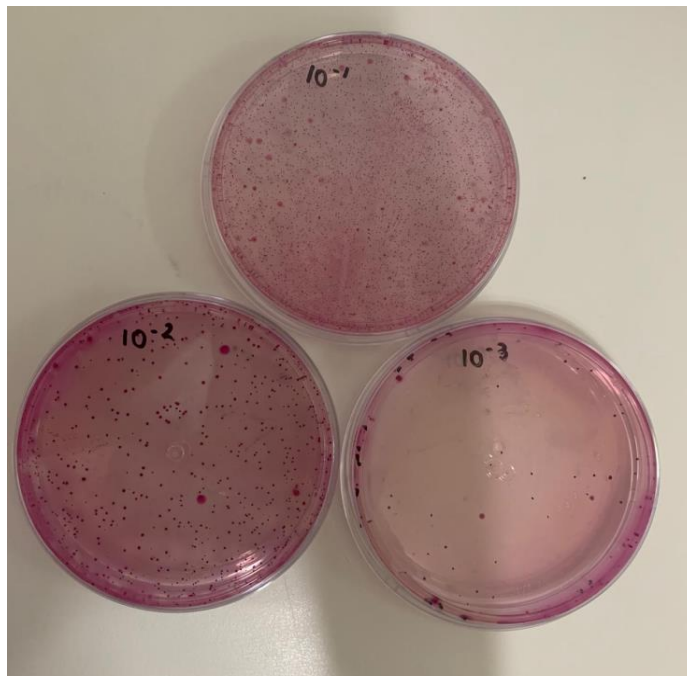
Para quantificação de coliformes totais foi utilizado o método descrito na ISO 4831:2012 e os métodos do "*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*" (American Public Health Association 2015).

##### **4.5.1. Teste presuntivo**

Após fazer diluições decimais da água de coco em água peptonada tamponada 0,1%, conforme descrito anteriormente, pipetou-se 1 ml de cada diluição para placa de Petri e realizou-se de seguida a incorporação de agar VRB (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente fundido e esterilizado. Após solidificação do agar, adicionou-se mais uma camada de agar e após a segunda solidificação as placas foram incubadas invertidas em estufa a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. A contagem das colônias características após incubação



(figura 9) foi efetuada da seguinte forma: selecionaram-se placas que apresentavam entre 15 e 150 colônias. Foram consideradas típicas as colônias rosadas, com 0,5 a 2 mm de diâmetro, apresentando ou não halo. O número de colônias foi contado e registrado, e retiraram-se 3 a 5 colônias para testes confirmatórios.



**Figura 9: Placas do meio VRB após incubação, com presença de colônias típicas (original, arquivo pessoal).**

#### **4.5.2. Confirmação de coliformes totais**

Dentre as colônias típicas, foram selecionadas 3 a 5 colônias e estas foram transferidas, uma a uma, para tubo com caldo verde brilhante com tubo de Durham invertido. Utilizaram-se 3 tubos sempre que a contagem total foi inferior a 1000 colônias, e 5 tubos se a contagem de colônias foi superior a 1000 colônias). Os tubos eram incubados em estufa a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Foram considerados positivos para coliformes totais os tubos que apresentaram turvação do meio e produção de gás (formação de bolha dentro do tubo de Durham), devido à fermentação da lactose presente no meio de cultura, sem película superficial. Eram verificados os tubos considerados positivos, registrados e encaminhados para confirmação de coliformes termotolerantes. Os outros tubos eram descartados.

#### **4.6. Contagem de Coliformes Termotolerantes**

Para a quantificação de coliformes termotolerantes foram utilizados protocolos estabelecidos de acordo com a ISO 4831:2012 e métodos do “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*” (APHA, 2015).

Dos tubos com reação positiva no teste de coliformes totais, foi retirada uma alíquota e transferida para tubo com caldo *Escherichia coli* (EC) (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil) e

tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados em estufa a 45°C por 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação do meio e produção de gás (formação de bolha dentro do tubo de Durham), devido à fermentação da lactose presente no meio de cultura. Os tubos considerados positivos foram registrados para cálculo do resultado final, de acordo com a técnica do número mais provável (NMP).

#### **4.7. Contagem de *Escherichia Coli***

Para contagem de *E. coli* foram utilizados protocolos estabelecidos de acordo com a ISO 4831:2012 e métodos do “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*” (APHA, 2015).

##### **4.7.1. Teste Indol**

Em cada tubo com evidências de desenvolvimento e produção de gás em caldo EC foi adicionado 0,5ml de Reagente de Kovac's, para verificar se ocorria formação de um anel vermelho, sendo este característico de reação positiva.

##### **4.7.2. Meio Eosina Azul de Metileno (EMB)**

A partir de cada tubo de caldo E.C positivo para coliformes termotolerantes, retirou-se uma alíquota com auxílio de uma ansa, efetuando-se sementeira por esgotamento numa placa de Petri contendo agar EMB (Merck, Darmstadt, Alemanha) que incubou a 35±2°C por 18-24 horas. Consideraram-se colônias típicas as que apresentaram tamanho grande, coloração preto-azulada, com reflexo verde metalizado ou não.

#### **4.8. Contagem de bolores e leveduras**

Para a análise de bolores e leveduras foram utilizados protocolos de pesquisa e quantificação de acordo com o disposto na ISO 6611:2004. Foram transferidas alíquotas de 1 ml das diluições consideradas necessárias para placas de Petri estéreis e vazias, após o que se incorporou agar DRBC (Laborclin, Pinhais, Brasil). Após solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas sem inverter em estufa a 25°C durante 3 a 5 dias.

As colônias de leveduras opacas, com forma irregular e de tamanho grande foram selecionadas e a multiplicação bacteriana em placa avaliada.

A contagem de colônias, o cálculo e a expressão dos resultados foi efetuada de acordo com a ISO 21527-2:2008.

#### **4.9. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos**

Para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foram utilizados protocolos de análise de acordo com ISO 4833-1:2013. Depois de preparadas as diluições decimais da amostra, foram transferidas alíquotas de 1 ml das diluições necessárias para placas de Petri estéreis e vazias. Foi vertido 15ml de agar PCA (Plate Count Agar) (Probac do Brasil, São

Paulo, Brasil) e após solidificação do meio de cultura as placas foram incubadas em estufa a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

Consideraram-se as placas que apresentavam entre 30 a 300 colónias, e procedeu-se à contagem das mesmas. O resultado final foi expresso em ufc/ml.

## **5. Delineamento experimental**

### **5.1. Análise microbiológica para controlo de qualidade interno**

Entre os meses de outubro de 2019 e março de 2020 foram feitas análises microbiológicas a 91 amostras de água de coco para efeitos de controlo de qualidade da empresa produtora. As amostras eram enviadas pela indústria diretamente para o laboratório, 2 a 3 vezes ao mês, de forma asséptica após passarem pelo processo de ultracongelação a  $-30^{\circ}\text{C}$  na indústria.

Foram feitas análises únicas para pesquisa e/ou quantificação de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* no dia de receção das amostras, e os resultados obtidos eram registrados em tabelas para controlo e organização interna do laboratório BQ.

### **5.2. Tratamento com radiação ultravioleta**

Foi desenvolvido um estudo de amostras de águas de coco processadas com radiação ultravioleta. Para realização do estudo foram recolhidas garrafas do produto final, água de coco, sendo que algumas amostras foram expostas a radiação ultravioleta e outras não passaram por nenhum tipo de tratamento ultravioleta. As amostras selecionadas para o estudo foram tratadas termicamente de diferentes formas, de acordo com protocolo desenvolvido para cada amostra.

Para o tratamento ultravioleta foram utilizadas lâmpadas de quartzo emitindo comprimentos de onda de aproximadamente 256 nanómetros (nm) sendo o tempo de exposição contínua de 60 segundos, de acordo com o protocolo desenvolvido pela empresa produtora de água de coco pré-embalada. Após o tratamento ultravioleta as amostras foram congeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$  ou refrigeradas a  $0-5^{\circ}\text{C}$ , dependendo do protocolo individual desenvolvido para a amostra.

### **5.3. Protocolos de aplicação de radiação ultravioleta**

Foram testados 3 tipos de protocolos experimentais para avaliar a eficácia do tratamento ultravioleta da água de coco.

Os protocolos foram desenvolvidos pela empresa responsável pela produção de água de coco pré-embalada, e foram sendo otimizados e alterados de acordo com os resultados e conclusões de cada protocolo.

Foi enviada uma única amostra tratada por cada protocolo para análise no laboratório, para posteriormente serem feitos mais estudos com maior número de amostras, visando a padronização de um dos protocolos de processamento para uso regular na indústria. Entretanto, a pesquisa foi interrompida por suspensão temporária da indústria.

#### 5.4. Protocolo 1

Conforme a tabela 2, foram recolhidas quatro amostras do lote NI01. Duas amostras (NI01a e NI01b) foram tratadas por radiação ultravioleta durante 60 segundos e logo após o tratamento a amostra NI01a passou pelo tratamento de ultracongelação a -30°C em túnel de congelação ultra-rápida, e a amostra NI01b foi refrigerada a 0-5°C em frigorífico. As outras duas amostras (NI01c e NI01d) não foram tratadas por radiação ultravioleta, contudo a amostra NI01c passou pelo tratamento de ultracongelação a -30°C em túnel de congelação ultra-rápida e a amostra NI01d foi refrigerada a 0-5°C, mantendo as mesmas condições descritas para as amostras tratadas com radiação ultravioleta.

**Tabela 2: Identificação das amostras de água de coco do lote NI01 considerando o uso de tratamento ultravioleta e arrefecimento aplicado.**

	Amostra NI01a	Amostra NI01b	Amostra NI01c	Amostra NI01d
Tratamento ultravioleta	Sim	Sim	Não	Não
Tratamento térmico	Ultracongelação	Refrigeração	Ultracongelação	Refrigeração

Foram feitas análises para pesquisa de *Salmonella* spp., quantificação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, pesquisa de *E. coli*, quantificação de mesófilos totais e quantificação de bolores e leveduras no dia 1 e no dia 15 após o fabrico.

#### 5.5. Protocolo 2

Foram recolhidas 2 amostras do lote 295 (Tabela 3). Uma amostra passou por tratamento ultravioleta durante 60 segundos e foi imediatamente ultracongelada a -30°C em túneis de congelação ultra-rápido (amostra 295a); a outra amostra foi ultracongelada à mesma temperatura e protocolo, entretanto sem aplicação de tratamento ultravioleta (amostra 295b).

**Tabela 3: Identificação das amostras de água de coco do lote 295 considerando o uso de tratamento ultravioleta e congelação aplicado.**

	Amostra 295a	Amostra 295b
Tratamento UV	Sim	Não
Tratamento térmico	Ultracongelação	Ultracongelação

As amostras foram analisadas considerando pesquisa de *Salmonella* spp., quantificação de coliformes totais, quantificação de coliformes termotolerantes, pesquisa de *E. coli*, quantificação de mesófilos totais e quantificação de bolores e leveduras nos dias 1, 10, e 15.

### 5.6. Protocolo 3

Realizou-se a recolha de 2 amostras do lote 338 (tabela 4). A amostra 338a foi tratada com radiação ultravioleta durante 60 segundos e imediatamente ultracongelada a -30°C em túneis de congelação ultra-rápida, enquanto a amostra 338b foi tratada por radiação ultravioleta e refrigerada a 0-5°C.

**Tabela 4: Identificação das amostras de água de coco do lote 338 considerando o uso de tratamento ultravioleta e tratamento térmico aplicado.**

	Amostra 338a	Amostra 338b
Tratamento UV	Sim	Sim
Tratamento térmico	Ultracongelação	Refrigerada

Foram feitas análises para pesquisa de *Salmonella* spp., quantificação de coliformes totais, quantificação de coliformes termotolerantes, pesquisa de *E. Coli*, quantificação de mesófilos totais e quantificação de bolores e leveduras nos dias 1, 10, e 15.

## 6. Análise de Dados

Todos os dados da avaliação das características microbiológicas e desenvolvimento de gráficos foram feitos informaticamente numa base de dados criada no programa MS Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

## 7. Resultados e Discussão

A utilização de tratamento ultravioleta em amostras de água de coco com diferentes tratamentos térmicos foi testada durante este estudo, visando a seleção de um novo tratamento de redução microbiana para ser utilizado na indústria de água de coco.

Uma das características do tratamento ultravioleta é o facto de inibir a multiplicação de microrganismos causando alterações sensoriais mínimas (Guerrero-Beltran and Barvosa-Canovas 2004). Ao inativar os microrganismos e o seu desenvolvimento,

proporciona uma maior vida útil dos produtos assim tratados, o que já foi comprovado em diversos tipos de alimentos, inclusive em amostras de água mineral e sumos (Tran and Farid 2006).

### **7.1. Análise microbiológica para controlo de qualidade**

Com intuito de realizar o controlo de qualidade interno da indústria, efetuou-se pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 ml, contagem de coliformes totais, contagem de coliformes termotolerantes e pesquisa de *E. coli*, às 91 amostras em estudo. Os resultados encontram-se ilustrados no Anexo 1.

#### **7.1.1. Pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 ml**

Não foi detetada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das 91 amostras analisadas.

#### **7.1.2. Contagem de coliformes totais**

A análise a coliformes totais apresentou resultados satisfatórios para todas as amostras. Os resultados obtidos variaram entre 1 log ufc/ml (limite inferior de deteção método) e 5.55 log ufc/ml, apresentando com valor médio de  $4.23 \pm 0.83$  log ufc/ml.

A legislação brasileira não prevê valores mínimos ou máximos para contagem de coliformes totais, sendo assim todas as amostras analisadas são consideradas conformes e aptas à comercialização e consumo.

#### **7.1.3. Contagem de coliformes termotolerantes**

Os resultados obtidos nas análises das 91 amostras de água de coco apresentaram valores entre 1 log ufc/ml (limite mínimo de deteção do método) e 4.77 ufc/ml, apresentando um valor médio de  $2.16 \pm 1.22$  log ufc/ml.

De acordo com a RDC 12 de janeiro de 2001, legislação vigente durante o período das análises, a quantidade máxima aceitável de coliformes termotolerantes, independentemente da espécie é de 2 log ufc/ml. Assim sendo, 46 amostras estariam em não conformidade legal, tornando-se inadequadas para consumo (resultados apresentados no anexo 1).

Já a Instrução Normativa 60 de 23 de dezembro de 2019, que a partir de 23 de dezembro de 2020 revogou a RDC 12 de janeiro de 2001, não indica limites máximos para a contagem de coliformes totais, sendo assim, utilizando apenas este parâmetro, todas as amostras seriam consideradas conformes e aptas para consumo, desde que sejam negativas para a presença de *E. coli*.

#### 7.1.4. Pesquisa e quantificação de *Escherichia coli*

Foi detetada presença de *E. coli* em 5 amostras. Os resultados obtidos nas análises das 5 amostras de água de coco que apresentaram resultado positivo para pesquisa de *E. coli* estão ilustrados na tabela 5, e representaram aproximadamente 5,49% do total de amostras analisadas.

A pesquisa de *E. coli* na amostra do lote 316 foi realizada em duplicado.

**Tabela 5: Resultados da pesquisa e quantificação de *E. coli* em amostras enviadas para controlo de qualidade industrial.**

Pesquisa de <i>E. coli</i>	Lote	Tubos positivos Caldo E.C	NMP (em log ufc/ml)
	316	1/3	3.77
	316	1/3	2.55
	337	1/3	2.46
	339	1/3	3.43
	357	1/3	3
	358	3/3	4.77

De acordo com a Instrução Normativa 60 de 23 de dezembro de 2019 é determinado o limite máximo de *E. coli* é de 2 log ufc/ml para sumos e outras bebidas “*in natura*” ou reconstituídas. Sendo assim, todas as amostras onde foi constatada a presença de *E. coli* foram consideradas não conformes para consumo.

#### 7.2. Protocolos com uso de tratamento ultravioleta

Para avaliação do tratamento ultravioleta foram testados pela empresa produtora de água de coco diferentes protocolos, com e sem o uso do tratamento ultravioleta, e diferentes tratamentos térmicos, como por exemplo a ultracongelação a -30°C e a refrigeração a 0-5°C.

Nas amostras analisadas, foram feitas a pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de coliformes totais, contagem de coliformes termotolerantes, pesquisa e quantificação de *E. coli*, contagem de mesófilos totais e contagem de bolores e leveduras.

##### 7.2.1. Resultado do protocolo 1

Os resultados obtidos para o protocolo 1 no dia 1 e dia 15 após fabrico estão ilustrados nas tabelas 6 e 7.

**Tabela 6: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 1 no dia 1 após fabrico, expressos em log ufc/ml.**

Protocolo 1 - DIA 1				
Amostras	NI01a	NI01b	NI01c	NI01d

Aplicação de ultravioleta	Sim		Não	
Tratamento térmico aplicado	Ultracongelamento	Refrigeração	Ultracongelamento	Refrigeração
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25ml	Ausente em 25ml	Ausente em 25ml	Ausente em 25ml
Coliformes totais	2.30	2.48	2.66	2.45
Coliformes termotolerantes	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
Mesófilos totais	2.36	2.92	3.02	3.48
Bolores e leveduras	1.95	2.91	2.52	2.90

**Tabela 7: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 1 no dia 15 após fabrico, expressos em log ufc/ml.**

Protocolo 1 - DIA 15				
Amostras	NI01a	NI01b	NI01c	NI01d
Aplicação de ultravioleta	Sim		Não	
Tratamento térmico aplicado	Ultracongelamento	Refrigeração	Ultracongelamento	Refrigeração
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25ml	Ausente em 25ml	Ausente em 25ml	Ausente em 25ml
Coliformes totais	3.78	6.30	4.46	6.32
Coliformes termotolerantes	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
Mesófilos totais	4.48	6.56	4.68	6.59
Bolores e leveduras	2.58	5.94	2.65	6.20

### 7.2.2. Resultado do protocolo 2

Os resultados obtidos para o protocolo 2 no dia 1, 10 e 15 após fabrico estão ilustrados na tabela 8.

**Tabela 8: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 2 no dia 1, 10 e 15 após fabrico, expressos em log ufc/ml.**



	Ultracongelção associado tratamento ultravioleta (295 <sup>a</sup> )			Ultracongelção sem tratamento ultravioleta (295 <sup>b</sup> )		
Lote 295	Dia 1	Dia 10	Dia 15	Dia 1	Dia 10	Dia 15
<i>Samonella</i> spp.	Ausente em 25ml			Ausente em 25ml		
Coliformes totais	1.67	1.95	2.79	4	4.38	4.83
Coliformes termotolerantes	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
Mesófilos totais	3.18	3.70	5.32	4.52	4.89	6.41
Bolores e leveduras	2.23	4.18	5.20	1.11	4.52	6.18

### 7.2.3. Resultado do protocolo 3

Os resultados das análises microbiológicas obtidos para o protocolo 3 nos dias 1, 10 e 15 após fabrico estão ilustrados na tabela 9.

**Tabela 9: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras submetidas ao protocolo 3 nos dias 1, 10 e 15 após fabrico, expressos em log ufc/ml.**

	Ultracongelção associado tratamento ultravioleta (338 <sup>a</sup> )			Refrigeração associado ao tratamento ultravioleta (338 <sup>b</sup> )		
Lote 338	Dia 1	Dia 10	Dia 15	Dia 1	Dia 10	Dia 15
<i>Samonella</i> spp.	Ausente em 25ml			Ausente em 25ml		
Coliformes totais	3	3.54	2.88	3.41	4.90	3.23
Coliformes termotolerantes	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
Mesófilos totais	3.18	3.90	4.70	3.53	5	3.48
Bolores e leveduras	2.87	3.08	5.08	2.90	3	3.72

### 7.2.4. Resultados de acordo com tratamento térmico - Ultracongelção a -30°C

Os resultados das amostras enviadas pela indústria e analisadas no laboratório BQ foram organizados de acordo com o tipo de tratamento aplicado (uso de radiação ultravioleta e binómio tempo-temperatura de arrefecimento).

Os protocolos de análises foram desenvolvidos pela empresa de água de coco, e a frequência das análises e tipo de tratamentos aplicados a cada lote variaram.

As amostras analisadas que sofreram o tratamento térmico ultracongelamento a -30°C foram: NI01a, NI01c, 295a, 295b e 338a.

O lote NI01 teve as amostras NI01a e NI01c analisadas apenas nos dias 1 e dia 15, já as amostras do lote 295 e lote 338 foram analisadas no dia 1, 10 e 15.

Os resultados obtidos após análise das amostras ultracongeladas a -30°C com e sem tratamento ultravioleta após processamento são apresentados nas tabelas 10, 11 e 12.

**Tabela 10: Resultados obtidos no dia 1 após fabrico das amostras NI01a, 295a, 338a, NI01c e 295b, expressos em log ufc/ml.**

ULTRAONGELAÇÃO A -30°C – DIA 1							
Amostras	NI01a	295a	338a	Média	NI01c	295b	Média
Aplicação de ultravioleta	Sim				Não		
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 ml				Ausente em 25 ml		
Coliformes totais	2.30	1.67	3.00	2.62	2.66	4	3.72
Coliformes termotolerantes	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
Mesófilos totais	2.11	3.18	3.18	2.77	3.02	4.52	4.23
Bolores e leveduras	1.95	2.23	2.87	2.52	2.52	1.11	1.88

As amostras NI01a, 295a e 338a foram submetidas ao mesmo tratamento térmico de ultracongelamento a -30°C associado a aplicação de ultravioleta, já as amostras NI01c e 295b foram submetidas ao tratamento térmico de ultracongelamento a -30°C sem a aplicação de ultravioleta. Apesar dos lotes serem distintos entre si, o processo produtivo aplicado foi o mesmo.

As amostras após ultracongelamento que passaram por tratamento ultravioleta quando comparadas com as amostras que não passaram por tratamento ultravioleta apresentaram

no dia 1 após fabrico os seguintes resultado: as amostras com aplicação de ultravioleta apresentaram menor desenvolvimento e contagem microbiológica para coliformes totais e mesófilos totais, porém maior desenvolvimento de bolores e leveduras quando comparadas com as amostras ultracongeladas a -30°C sem aplicação de ultravioleta.

As amostras submetidas a ultracongelação a -30°C associada ao tratamento ultravioleta apresentaram na contagem de coliformes totais um valor médio de  $2.62 \pm 0,66$  log ufc/ml. Já as amostras submetidas a ultracongelação sem associação ao tratamento ultravioleta apresentaram um valor médio de  $3.72 \pm 0.95$  log ufc/ml nas contagens de coliformes totais.

Todas as amostras que passaram por tratamento ultravioleta após a ultracongelação apresentaram valores médios de contagem de coliformes totais inferiores a  $4.23 \log \text{ ufc/ml} \pm 0.83$ , valor obtido para as 91 amostras do controlo de qualidade.

A média dos resultados obtidos para contagem de mesófilos totais foi menor para as amostras ultracongeladas após o uso do tratamento ultravioleta do que para as amostras que passaram apenas por ultracongelação após o fabrico sem aplicação de radiação ultravioleta.

Em relação aos mesófilos totais o valor médio obtido após tratamento de ultracongelação associado ao ultravioleta foi de  $3.02 \pm 0.61$  log ufc/ml, enquanto que para o mesmo tratamento térmico sem aplicação de ultravioleta foi de  $4.23 \pm 1.21$  log ufc/ml.

No caso dos bolores e leveduras, após tratamento ultravioleta, no dia 1 após fabrico, as amostras ultracongeladas apresentaram um valor médio de  $2.52 \pm 0.46$  log ufc/ml, enquanto a amostra sem tratamento ultravioleta apresentou um valor médio de  $1.88 \pm 0.72$  log ufc/ml. Na presente análise, os resultados obtidos para as amostras após tratamento ultravioleta foram superiores do que o resultado obtido para as amostras sem aplicação do ultravioleta.

**Tabela 11: Resultados microbiológicos obtidos no dia 10 após fabrico das amostras 295a, 338a e 295b, expressos em log ufc/ml.**

ULTRACONGELAÇÃO A - 30°C – DIA 10				
Amostras	295a	338a	Média	295b
Aplicação de ultravioleta	Sim			Não
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25ml			Ausente em 25ml
Coliformes totais	1.95	3.54	3.26	4.38

<b>Coliformes termotolerantes</b>	<1	<1	<1	<1
<b><i>E. coli</i></b>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
<b>Mesófilos totais</b>	3.70	3.90	3.81	4.89
<b>Bolores e leveduras</b>	4.18	3.08	3.91	4.52

As amostras ultracongeladas após tratamento ultravioleta apresentaram um valor médio para contagem de coliformes totais de  $3.26 \pm 1.12$  log ufc/ml.

Em relação a contagem de mesófilos totais as amostras ultracongeladas após tratamento ultravioleta apresentaram valores médios de  $3.81 \pm 0.14$  log ufc/ml.

Quanto aos bolores e leveduras, estes apresentaram valor médio de  $3.91 \pm 0.77$  log ufc/ml.

É possível observar que para as amostras ultracongeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$  após tratamento ultravioleta, o resultado obtido em todas as contagens é menor quando comparado com a contagem da amostra única sem tratamento ultravioleta. Estes resultados sugere que o uso de ultravioleta poderá ser vantajoso na redução do desenvolvimento de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli*, mesófilos totais e bolores e leveduras, similarmente aos resultados obtidos por Braga (2018), Gabriel (2012) e Ukuku and Geveke (2010). Entretanto, no futuro, um estudo com um número maior de amostras para cada tipo de tratamento será essencial para poder avaliar a variabilidade e significância dos resultados.

Não foi identificada a presença de *Salmonella* spp., e de *E. coli* em nenhuma amostra, independentemente do tipo de tratamento térmico ou ultravioleta aplicado. Em nenhuma análise houve multiplicação de coliformes termotolerantes.

A amostra do lote NI01a e NI01c não foi analisada no dia 10, e não há amostra do lote 338 sem aplicação de tratamento ultravioleta.

**Tabela 12: Resultados microbiológicos obtidos no dia 15 após fabrico das amostras NI01a, 295a, 338a, NI01c e 295b, expressos em log ufc/ml.**

ULTRACONGELAÇÃO A $-30^{\circ}\text{C}$ – DIA 15							
Amostras	NI01a	295a	338a	Média	NI01c	295b	Média
<b>Aplicação de ultravioleta</b>	Sim				Não		
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	Ausente em 25 ml				Ausente em 25 ml		

<b>Coliformes totais</b>	3.78	2.79	2.88	3.39	4.46	4.83	4.69
<b>Coliformes termotolerantes</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b><i>E. coli</i></b>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
<b>Mesófilos totais</b>	4.48	5.32	4.70	4.98	4.68	6.41	6.13
<b>Bolores e leveduras</b>	2.58	5.20	5.08	4.97	2.65	6.18	5.88

As amostras ultracongeladas após tratamento ultravioleta apresentaram valores médios para contagem de coliformes totais de  $3.39 \pm 0.5$  log ufc/ml. Ao mesmo tempo, a média obtida para o mesmo tratamento térmico sem aplicação de ultravioleta foi de  $4.69 \pm 0.26$  log ufc/ml.

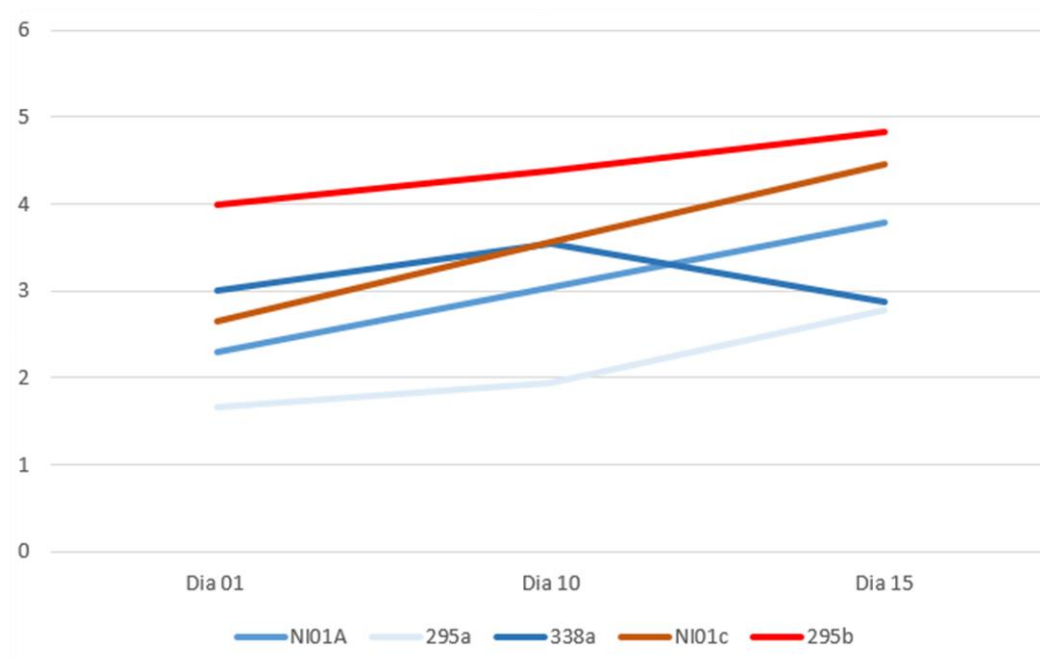
Em relação à contagem de mesófilos totais, as amostras ultracongeladas após tratamento ultravioleta apresentaram valores médios de  $4.98 \pm 0.44$  log ufc/ml. Os valores obtidos para as amostras ultracongeladas sem aplicação de ultravioleta foram superiores, sendo a média para contagem de mesófilos totais  $6.13 \pm 1.23$  log ufc/ml.

Para as análises realizadas no dia 15 após fabrico, as amostras ultracongeladas após aplicação do tratamento ultravioleta apresentaram na contagem de bolores e leveduras um valor médio de  $4.97 \pm 1.48$  log ufc/ml. As amostras com o mesmo tratamento térmico sem aplicação de ultravioleta apresentaram valores médios de  $5.88 \pm 2.49$  log ufc/ml.

É possível observar que para as amostras ultracongeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$  após tratamento ultravioleta, o resultado obtido em todas as contagens no dia 15 após fabrico é menor quando comparado com as médias de contagem das amostras sem tratamento ultravioleta. Estes resultados sugerem que o uso de ultravioleta poderá ser vantajoso na redução do desenvolvimento de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli*, mesófilos totais e bolores e leveduras.

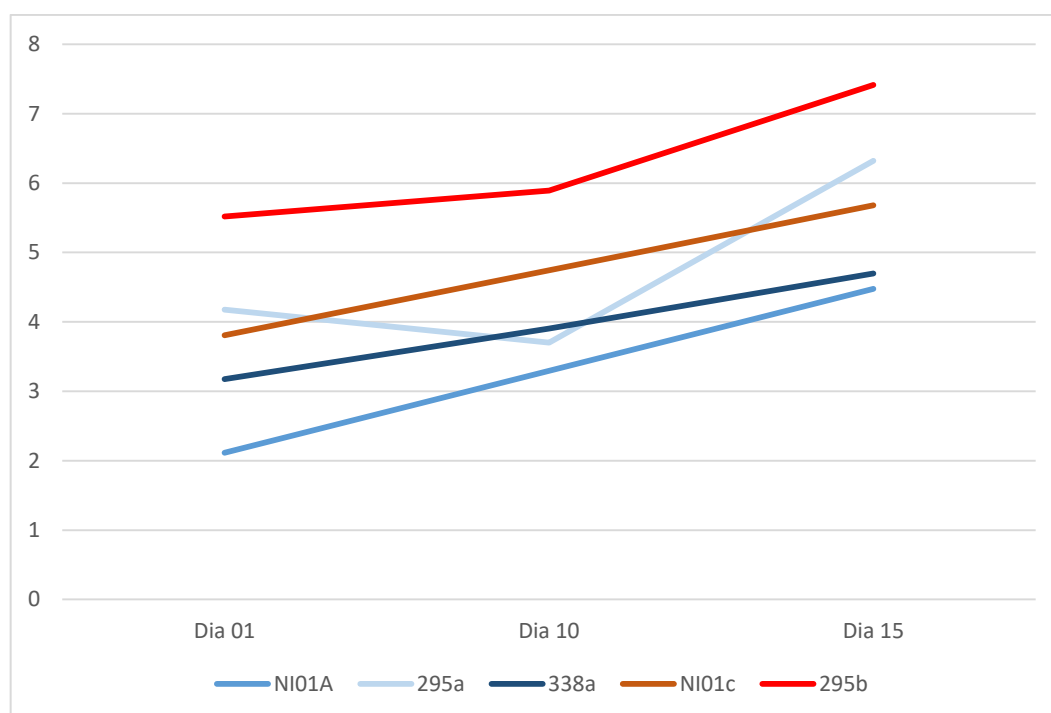
Os resultados obtidos nesta análise não podem ser comparados com os resultados das 91 amostras de controlo de qualidade, já que não houve análise das amostras no dia 15 após fabrico.

É possível observar no gráfico 1, que para as amostras ultracongeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$  após tratamento ultravioleta, o resultado obtido em todas as contagens de coliformes totais das amostras que passaram por tratamento ultravioleta é menor quando comparado com as médias de contagem das amostras sem tratamento ultravioleta.



**Gráfico 1: Média das contagens de coliformes totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a ultracongelamento a -30°C com (azul) e sem (vermelho) o uso de ultravioleta.**

Em relação a contagem de mesófilos totais o mesmo padrão é observado, onde a contagem de microrganismos ao longo do tempo mostrou-se inferior nas amostras tratadas com ultravioleta após ultracongelamento a -30°C do que nas amostras que passaram apenas pelo mesmo tratamento térmico sem aplicação de ultravioleta.

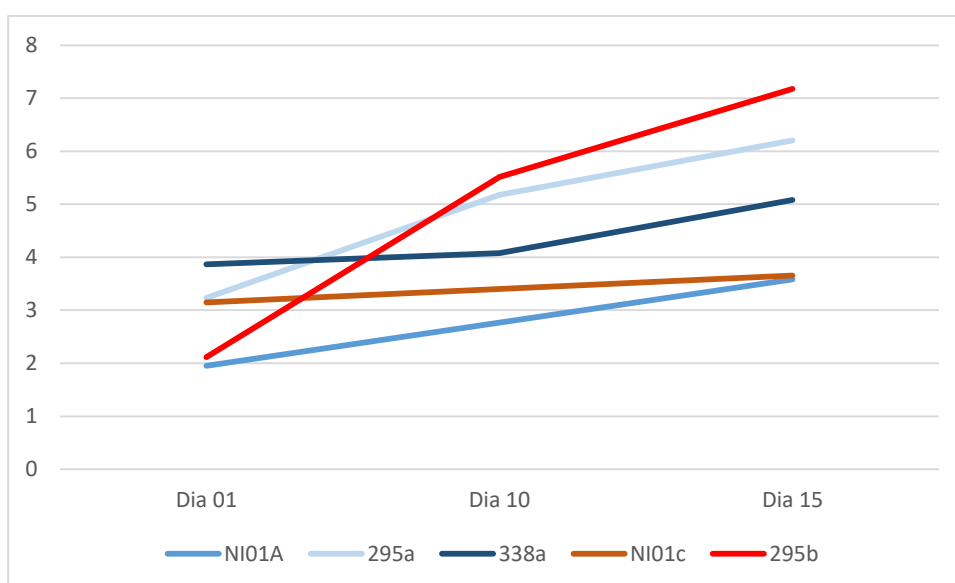


**Gráfico 2: Média das contagens de mesófilos totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a ultracongelamento a -30°C com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.**

Em relação à quantificação de bolores e leveduras, houve uma maior divergência de resultados.

As amostras do lote NI01 seguiram o mesmo padrão de resultados obtidos nas amostras anteriores, tendo a amostras NI01a apresentado contagem de bolores e leveduras inferiores para as amostras ultracongeladas com a associação do tratamento ultravioleta do que a amostra NI01c, amostra com mesmo tratamento térmico porém sem associação do uso do ultravioleta.

Em relação ao lote 295, a amostra 295a, ultracongelada com aplicação de ultravioleta, apresentou valores mais elevados de contagem de bolores e leveduras do que a amostra 295b, que teve o mesmo tratamento térmico aplicado porém sem associação do uso de ultravioleta.



**Gráfico 3: Média da contagem de bolores e leveduras (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a ultracongelação a -30°C com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.**

Em 2017, Floriano avaliou a eficiência do tratamento ultravioleta na inativação de esporos de *Penicillium expansum* em sucos de maçã, obtendo curvas de inativação com resultados satisfatórios se houvesse um aumento da intensidade da radiação ou tempo de exposição.

Noutro estudo, realizado por Koutchma (2004), concluiu-se que um dos grandes entraves da aplicação de radiação ultravioleta em líquidos baseia-se na variabilidade de composição e turbidez dos líquidos. A água de coco é um produto com turbidez e concentração de sólidos solúveis e insolúveis variáveis. Quando dentro do fruto, a água de coco é estéril, porém, após contato com o meio externo e manipulações várias, contamina-se, sendo um meio muito rico para o desenvolvimento microbiano.

Em estudos como o de Carvalho et al. (2006) e Costa et al. (2006) foi demonstrada a variação das características físico-químicas e nutricionais da água de coco de diferentes frutos, por devido a alterações no solo, idade do fruto e espécie. As características com maior variabilidade são: açúcares, teores de gorduras e composição mineral.

Ainda que não existam estudos do uso de radiação ultravioleta para o tratamento específico de água de coco, ao avaliar estudos anteriores com o uso de ultravioletas em bebidas como sumos e água mineral (Braga 2018; Floriano 2017), os resultados revelaram uma diminuição da carga microbiológica quando comparada com amostras com outro tratamento térmico.

#### 7.2.5. Resultados de acordo com tratamento térmico – Refrigeração a 0-5°C

Os protocolos de análises foram desenvolvidos pela empresa de água de coco e a frequência para análises e tratamentos aplicados em cada lote variaram.

As amostras analisadas que sofreram o tratamento térmico de refrigeração a 0-5°C foram: NI01b, NI01d, e 338b.

As amostras dos lotes NI01b, NI01d e 338b foram mantidas em refrigeração a 0-5°C, sendo que as amostras dos lotes NI01b e 338b passaram por tratamento ultravioleta e a amostra NI01d não.

Os resultados obtidos para as análises dos dias 1, 10 e 15 estão ilustrados na tabela abaixo.

**Tabela 14: Resultados obtidos no dia 1 após fabrico das amostras NI01b, 338b e NI01d, expressos em log ufc/ml.**

REFRIGERAÇÃO A 0-5°C – DIA 1				
Amostras	NI01b	338b	Média	NI01d
Aplicação de ultravioleta	Sim			Não
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 ml	Ausente em 25 ml	Ausente em 25 ml	Ausente em 25 ml
Coliformes totais	2.48	3.41	3.15	2.45
Coliformes termotolerantes	<1	<1	<1	<1
<i>E. coli</i>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
Mesófilos totais	2.92	3.53	3.33	3.48
Bolores e leveduras	2.91	2.90	2.91	2.90



É possível observar na tabela 14 que a média para contagem para coliformes totais e bolores e leveduras foi mais elevada nas amostras refrigeradas e tratadas com radiação ultravioleta, do que na amostra única com o mesmo tratamento térmico que não passou pelo tratamento ultravioleta.

As amostras refrigeradas a 0-5°C após tratamento ultravioleta apresentaram contagens médias de coliformes totais de  $3.15 \pm 0.66$  log ufc/ml, ao mesmo tempo, a amostra NI01d que foi mantida nas mesmas condições térmicas, porém sem uso prévio de ultravioleta, apresentou valor de 2.45 log ufc/ml.

Considerando os valores obtidos para contagem de bolores e leveduras no dia 1 após fabrico das amostras refrigeradas, as amostras que passaram por tratamento ultravioleta apresentaram valores médios de  $2.91 \pm 0.0075$  log ufc/ml, enquanto a amostra única sem aplicação de tratamento ultravioleta apresentou uma contagem de 2.90 log ufc/ml. Para cálculo da média e desvio padrão, além da análise de significância do tratamento, é necessário um número maior de amostras.

Ao comparar apenas as amostras do lote NI01b e NI01d, provenientes do mesmo lote, os valores apresentados são similares (tabela 14). Já ao comparar com a amostra do lote 338, a diferença entre as contagens para coliformes totais e bolores e leveduras apresenta-se mais expressiva, facto que poderia ser explicado pela diferença entre as características intrínsecas da água de coco de um fruto/lote para outro. Porém, sempre que possível, seria desejável comparar amostras de um mesmo lote entre si, ao invés de diferentes lotes, até que seja estabelecida uma padronização de análises e protocolos.

No caso da média das contagens de mesófilos totais, a amostra refrigerada a 0-5°C com a associação do tratamento ultravioleta apresentou menor contagem de microrganismos do que a amostra refrigerada a 0-5°C e sem tratamento ultravioleta; contudo, o reduzido número de amostras é um entrave para generalizações.

As amostras refrigeradas a 0-5°C após tratamento ultravioleta apresentaram contagem médias de mesófilos totais de  $3.33 \pm 0.42$  log ufc/ml.

**Tabela 15: Resultado obtido no dia 10 após fabrico da amostra 338b, expressos em log ufc/ml.**

REFRIGERAÇÃO – DIA 10	
<b>Amostra</b>	338b
<b>Aplicação de ultravioleta</b>	Sim
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	Ausente em 25 ml

<b>Coliformes totais</b>	4.90
<b>Coliformes termotolerantes</b>	<1
<b><i>E. coli</i></b>	Não detetado
<b>Mesófilos totais</b>	5
<b>Bolores e leveduras</b>	3

Conforme ilustrado na tabela 15, somente a amostra 338b passou por análise microbiológica no dia 10 após fabrico, não sendo possível fazer comparações com outras amostras com o mesmo tratamento durante este momento.

**Tabela 16: Resultados obtidos no dia 15 após fabrico das amostras NI01b, 338b e NI01d, expressos em log ufc/ml.**

<b>REFRIGERAÇÃO – DIA 15</b>				
<b>Amostras</b>	NI01b	338b	Média	NI01d
<b>Aplicação de ultravioleta</b>	Sim			Não
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	Ausente em 25 ml	Ausente em 25 ml	Ausente em 25 ml	Ausente em 25 ml
<b>Coliformes totais</b>	3.30	3.23	6	6.32
<b>Coliformes termotolerantes</b>	<1	<1	<1	<1
<b><i>E. coli</i></b>	Não detetado	Não detetado	Não detetado	Não detetado
<b>Mesófilos totais</b>	4.56	3.48	4.29	6.59
<b>Bolores e leveduras</b>	5.94	3.72	5.65	6.20

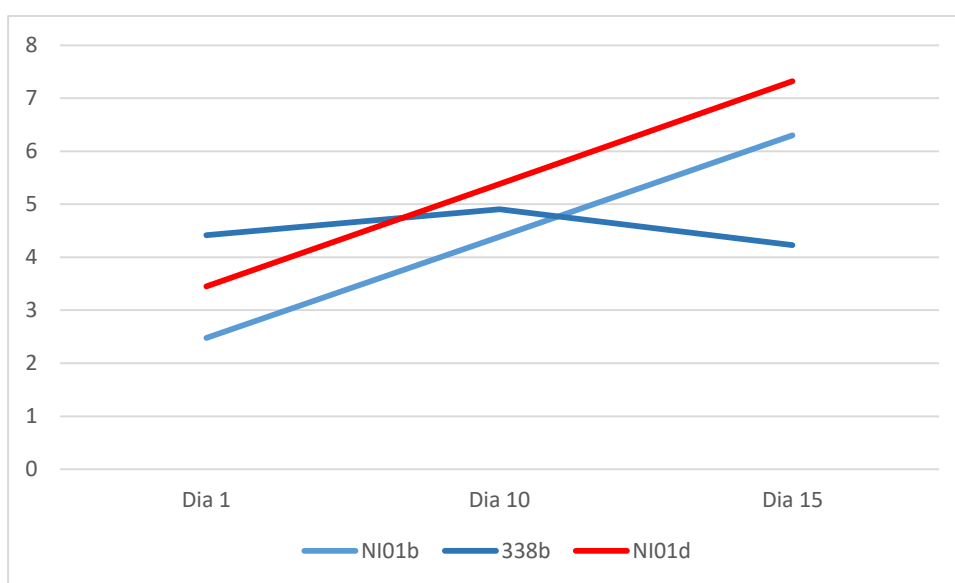
Em relação às análises realizadas no dia 15 após fabrico, as amostras NI01b e 338b, amostras refrigeradas a 0-5°C e que passaram por tratamento ultravioleta, apresentaram valores mais baixos de contagens de coliformes totais, mesófilos totais e bolores e leveduras, do que a amostra NI01d, amostra única que passou pelo mesmo tratamento térmico, mas sem a aplicação do tratamento ultravioleta.

A média para contagem de coliformes totais no dia 15 após fabrico, para as amostras refrigeradas a 0-5°C após tratamento ultravioleta foi de  $6.00 \pm 1.69$  log ufc/ml. Já a amostra NI01d, amostra única com o mesmo tratamento térmico, porém sem aplicação de ultravioleta apresentou como contagem de coliformes totais o valor de 6.32 log ufc/ml.

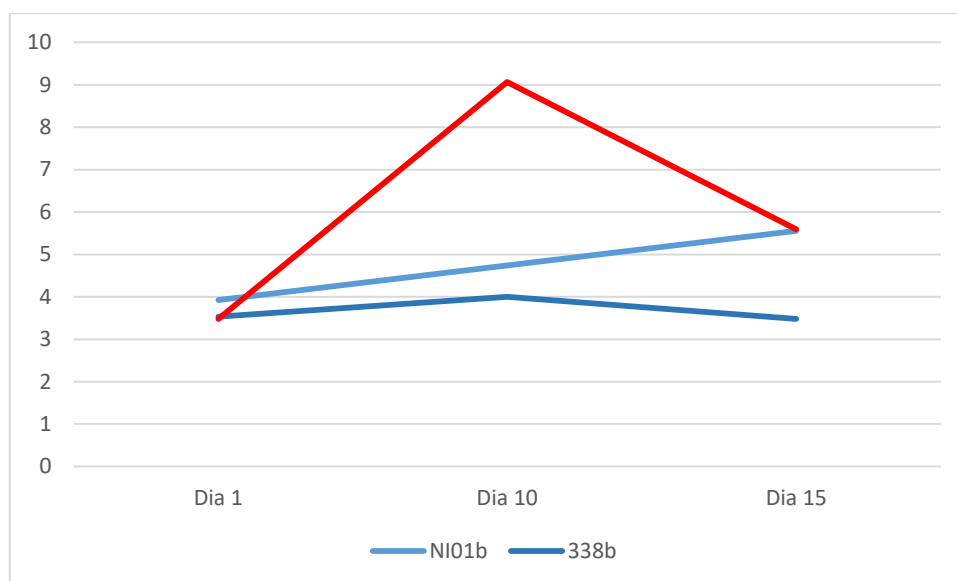
A média obtida para mesófilos totais após tratamento ultravioleta associado a refrigeração foi de  $4.29 \pm 0.76$  log ufc/ml. A amostra única sem tratamento ultravioleta, porém com o mesmo tratamento térmico, apresentou o valor de 6.59 log ufc/ml.

A média da contagem de bolores e leveduras após tratamento ultravioleta associado a refrigeração foi  $5.65 \pm 1.56$  log ufc/ml. No caso da amostra única NI01d, o valor obtido foi de 6.20 log ufc/ml.

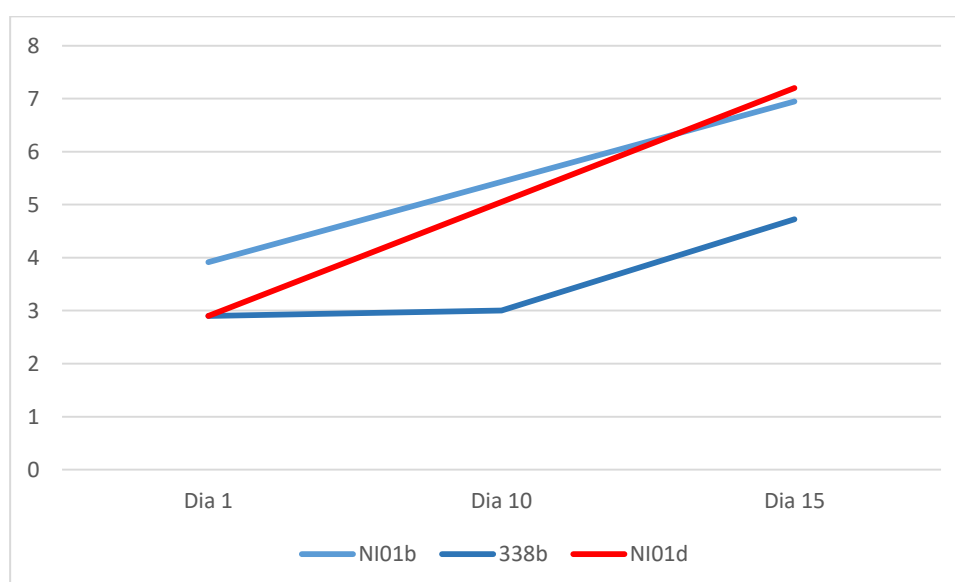
É possível observar nos gráficos 4, 5 e 6 que ao longo do tempo, entre o dia 1 e 15 após fabrico das amostras, as amostras NI01b e 338, amostras refrigeradas após tratamento ultravioleta, apresentaram valores inferiores para contagem de coliformes totais, mesófilos totais e bolores e leveduras quando comparados com a amostra NI01d, refrigerada a 0-5°C sem aplicação do tratamento ultravioleta.



**Gráfico 4: Média das contagens de coliformes totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a refrigeração a 0-5°C com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.**



**Gráfico 5: Média das contagens de mesófilos totais (log ufc/ml) nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a refrigeração a 0-5°C com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.**



**Gráfico 6: Média das contagens de bolores e leveduras nos dias 1, 10 e 15 após fabrico das amostras submetidas a refrigeração a 0-5°C com (azul) e sem (vermelho) uso de ultravioleta.**

## 8. Conclusão

Ao propor-se o delineamento inicial de um protocolo de controlo de qualidade em água de coco, procurou-se na literatura técnicas de tratamento possíveis para esse alimento, de modo a implementar um possível protocolo que atendesse aos critérios microbiológicos da legislação vigente. No que se refere ao controlo de qualidade de alimentos, a legislação brasileira estabelece critérios de qualidade sem, no entanto, impor as técnicas que devem ser utilizadas para que esses critérios sejam atendidos. Nesse sentido, esse trabalho propôs avaliar a eficácia das técnicas de refrigeração e ultracongelamento, com

e sem associação de ultravioleta, no tratamento industrial de água de coco pré-embalada, ao longo da vida útil comercial.

Todas as amostras que passaram pelo tratamento de ultracongelamento associado ao uso de ultravioleta apresentaram resultados microbiológicos (quantificação de coliformes totais, de mesófilos totais e de bolores e leveduras) inferiores aos obtidos nas amostras que sofreram ultracongelamento sem aplicação de ultravioleta.

Em relação às amostras que foram refrigeradas, ao comparar os resultados obtidos individualmente por lote, todas as amostras que passaram por tratamento ultravioleta apresentaram contagens de coliformes totais, de mesófilos totais e de bolores e leveduras inferiores às amostras com o mesmo tratamento térmico sem aplicação de ultravioleta.

Todavia, de um modo geral verificou-se uma maior discrepância entre os resultados das amostras refrigeradas relativamente aos obtidos nas amostras ultracongeladas com associação ao tratamento ultravioleta.

Ainda que a inclusão da etapa de tratamento ultravioleta tenha demonstrado eficácia na redução das contagens microbiológicas avaliadas, ela não foi essencial para que as amostras fossem mantidas dentro dos parâmetros de qualidade exigidos na legislação, visto que os tratamentos de refrigeração e ultracongelamento foram suficientes para cumprir esse objetivo, mesmo quando usados isoladamente.

Dada a dificuldade associada à natureza do alimento em estudo, devido à variabilidade na composição (açúcares, sais, pH, gorduras, etc.), mas também pela aplicação do tratamento ultravioleta (que impõe o uso de um agitador, devido à turbidez da água de coco), este trabalho sugere que o tratamento ultravioleta pode ser uma alternativa para a redução do teor microbiano, com o consequente aumento da vida útil da água de coco industrial.

Tendo em vista os resultados obtidos, sugere-se que a continuidade deste trabalho se faça no sentido de validação do protocolo de ultracongelamento combinada com tratamento ultravioleta. Contudo, é fundamental que este estudo seja desenvolvido com um maior número de amostras, representativas de diferentes lotes de fabrico e associado a outras determinações, nomeadamente organoléticas.

## **9. Anexos**

**Anexo 1: Resultados microbiológicos obtidos nas amostras de água de coco analisadas para efeito de controlo de qualidade interno.**

<b>Amostr a nº</b>	<b>Lote</b>	<b>Quantidad e (ml)</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>Coliformes Totais (ufc/ml)</b>	<b>Coliformes Termotolerantes (ufc/ml)</b>	<b><i>E. Coli</i> (tubos)</b>
1	269	300	Ausência em 25 ml	1,2x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>1</sup>	-
2	270	300	Ausência em 25 ml	5,4x10 <sup>2</sup>	5,4x10 <sup>2</sup>	0/3
3	273	300	Ausência em 25 ml	3,6x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	0/3
4	274	300	Ausência em 25 ml	6,2x10 <sup>2</sup>	4,1x10 <sup>2</sup>	0/3
5	277	300	Ausência em 25 ml	1,5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>2</sup>	0/3
6	275	2000	Ausência em 25 ml	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	0/3
7	276	1000	Ausência em 25 ml	3,4x10 <sup>2</sup>	3,4x10 <sup>2</sup>	0/3
8	288	300	Ausência em 25 ml	3,7x10 <sup>3</sup>	3,7x10 <sup>3</sup>	0/3
9	284	300	Ausência em 25 ml	9,8x10 <sup>2</sup>	9,8x10 <sup>2</sup>	0/3
10	287	300	Ausência em 25 ml	2,2x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	0/3
11	289	500	Ausência em 25 ml	4,2x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>1</sup>	-
12	290	300	Ausência em 25 ml	2,6x10 <sup>4</sup>	8x10 <sup>3</sup>	0/3
13	291	300	Ausência em 25 ml	1,6x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>1</sup>	-
14	280	300	Ausência em 25 ml	2x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	0/3
15	304	200	Ausência em 25 ml	1,2x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>1</sup>	-
16	301	300	Ausência em 25 ml	1,1x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>1</sup>	-
17	303	300	Ausência em 25 ml	2,7x10 <sup>2</sup>	9x10 <sup>1</sup>	0/3

18	298	300	Ausência em 25 ml	$2,4 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
19	297	300	Ausência em 25 ml	$5,3 \times 10^2$	$8,3 \times 10^1$	0/3
20	296	300	Ausência em 25 ml	$3,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	0/3
21	295	300	Ausência em 25 ml	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	0/3
22	294	300	Ausência em 25 ml	$1,2 \times 10^2$	$4 \times 10^1$	-
23	302	500	Ausência em 25 ml	$1,1 \times 10^3$	$3 \times 10^2$	0/3
24	308	300	Ausência em 25 ml	$4,1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	0
25	309	300	Ausência em 25 ml	$8,8 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
26	316	300	Ausência em 25 ml	$1,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	1/3
27	310	500	Ausência em 25 ml	$3,4 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	-
28	318	300	Ausência em 25 ml	$8,7 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	0/3
29	311	300	Ausência em 25 ml	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	0/3
30	317	2000	Ausência em 25 ml	$6,4 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	0/3
31	315	300	Ausência em 25 ml	$6,8 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$	0/3
32	312	300	Ausência em 25 ml	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
33	330	300	Ausência em 25 ml	$8,6 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
34	325	300	Ausência em 25 ml	$9,1 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
35	336	300	Ausência em 25 ml	$4,7 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
36	333	300	Ausência em 25 ml	$7,2 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-

37	329	300	Ausência em 25 ml	$4,4 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	-
38	322	300	Ausência em 25 ml	$4,6 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
39	324	300	Ausência em 25 ml	$1,5 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
40	323	300	Ausência em 25 ml	$7,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	0/3
41	332	300	Ausência em 25 ml	$9,8 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
42	338	300	Ausência em 25 ml	$1,8 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
43	326	300	Ausência em 25 ml	$5,7 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$	0/3
44	331	2000	Ausência em 25 ml	$1 \times 10^3$	$3 \times 10^2$	0/3
45	337	300	Ausência em 25 ml	$8,9 \times 10^2$	$8,9 \times 10^2$	1/3
46	316	300	Ausência em 25 ml	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	1/3
47	339	300	Ausência em 25 ml	$8,1 \times 10^3$	$8,1 \times 10^3$	1/3
48	340	2000	Ausência em 25 ml	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^2$	0/3
49	343	1000	Ausência em 25 ml	$6,2 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
50	341	300	Ausência em 25 ml	$3,1 \times 10^2$	$1 \times 10^2$	0/3
51	345	500	Ausência em 25 ml	$2,1 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
52	352	300	Ausência em 25 ml	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^1$	-
53	351	300	Ausência em 25 ml	$8 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
54	347	300	Ausência em 25 ml	$2,8 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
55	348	300	Ausência em 25 ml	$5,9 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-



56	350	300	Ausência em 25 ml	$2,9 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
57	346	300	Ausência em 25 ml	$3,6 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
58	358	300	Ausência em 25 ml	$6 \times 10^4$	$6 \times 10^4$	3/3
59	354	300	Ausência em 25 ml	$3,5 \times 10^4$	$1 \times 10^1$	
60	357	300	Ausência em 25 ml	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	1/3
61	353	300	Ausência em 25 ml	$1,3 \times 10^4$	$1 \times 10^1$	-
62	15	1000	Ausência em 25 ml	$2,2 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
63	14	300	Ausência em 25 ml	$2,9 \times 10^3$	$9 \times 10^2$	0/3
64	10	2000	Ausência em 25 ml	$3,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	0/3
65	13	300	Ausência em 25 ml	$1,6 \times 10^2$	$5 \times 10^1$	0/3
66	9	300	Ausência em 25 ml	$1,8 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	-
67	8	300	Ausência em 25 ml	$3,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	0/3
68	7	500	Ausência em 25 ml	$8 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
69	6	500	Ausência em 25 ml	$2,4 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
70	361	300	Ausência em 25 ml	$7 \times 10^3$	$7 \times 10^3$	0/3
71	360	300	Ausência em 25 ml	$2,1 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
72	339	300	Ausência em 25 ml	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	-
73	316	300	Ausência em 25 ml	$1,8 \times 10^3$	$6 \times 10^2$	0/3
74	30	300	Ausência em 25 ml	$2,6 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	0/3

75	22	300	Ausência em 25 ml	$2,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	0/3
76	24	300	Ausência em 25 ml	$6,4 \times 10^1$	$4,2 \times 10^1$	0/3
77	28	300	Ausência em 25 ml	$4,1 \times 10^3$	$1 \times 10^1$	-
78	17	300	Ausência em 25 ml	$4,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	0/1
79	29	300	Ausência em 25 ml	$1,9 \times 10^5$	$6 \times 10^4$	0/3
80	16	300	Ausência em 25 ml	$4,5 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	0/3
81	31	300	Ausência em 25 ml	$2,2 \times 10^3$	$7 \times 10^2$	0/3
82	34	300	Ausência em 25 ml	$4,8 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	0/3
83	23	500	Ausência em 25 ml	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	0/3
84	27	300	Ausência em 25 ml	$3,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	0/3
85	20	300	Ausência em 25 ml	$2,5 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
86	41	1000	Ausência em 25 ml	$6 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
87	42	1000	Ausência em 25 ml	$2,3 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
88	38	500	Ausência em 25 ml	$1,4 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
89	36	500	Ausência em 25 ml	$9 \times 10^2$	$6 \times 10^2$	0/3
90	37	300	Ausência em 25 ml	$2,4 \times 10^2$	$1 \times 10^1$	-
91	35	200	Ausência em 25 ml	$7,4 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$	0/3
<b>Média</b>	-	-	-	<b><math>1,7 \times 10^4</math></b>	<b><math>4,2 \times 10^3</math></b>	-

## 10. Bibliografia

Abreu FAP, Souza ACR. 2017. Água de Coco Pasteurizada em Sistemas HTST: Fabricação em Pequenas e Médias Escalas de Processamento. Comunicado Técnico ISSN; [Internet] [accessed February 2020 10] [7 p.]. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1068837/agua-de-coco-pasteurizada-em-sistemas-htst-fabricacao-em-pequenas-e-medias-escalas-de-processamento>

ABNT NBR ISO 6887-5:2010 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - rules for the preparation of suspension samples for microbiological examination.

Amaral DS, Pessoa T, Dantas LIS, Medeiros SSSS. 2012. Elaboração de água de coco congelada e avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável. 7(1):177-181. URL: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1101>

American Public Health Association (APHA). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Baltimore, Maryland.

Aragão WM, Resende JM, Cruz EMO, Reis CS, Saggin OJ, Alencar JA, Moreira WA, Paula FR, Lima JMP. 2002. Fruto do coqueiro para consumo natural. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica. Chapter 3, p. 19-25.

Citação em texto: (Aragão et al. 2002)

Aroucha EMM, Souza MS, Soares KMP. 2014. Análise físico-química e sensorial de água-de-coco em função de estágio de maturação das cultivares de coco anão verde e vermelho. Agropecuaria Científica no Semiárido. 10(1):33-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v10i1.419>

Assis JS, Resende JM, Silva FOE, Santos CR, Nunes F. 2000. Técnica para colheita e pós-colheita do coco verde. [Internet]. [accessed April 2020 14]:[6 p.] <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/8868/1/COT95.pdf>

Barbosa-Canovas GV, Pothakamury UR, Palou E, Swanson BG. 1998. Nonthermal preservation of foods. New York: Marcel Dekker, Inc.

Bolton JR, Cotton, CA. 2008. The ultraviolet disinfection-Handbook. American water works association. U.S.A

Bolton JR. 2010. Ultraviolet applications handbook, Bolton Photosciences Inc.

Braga MC. 2018. Aplicação de radiação ultravioleta na inativação de microrganismos deteriorantes de alimentos [Dissertação de mestrado]. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina.

Brito CS, Rossi DA. 2005. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja in natura e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia. Bioscience Journal, Uberlândia. 21(1):133-140. URL: <http://200.19.146.79/index.php/biosciencejournal/article/view/6572>

Cabral LMC, Penha EM, Matta VM. 2005. Água de Coco Verde Refrigerada. Embrapa informação Tecnológica. Brasília, DF. [Internet]. [acessed April 2020 12]:[34 p.]. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100270/1/FL-0171.pdf>

Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Kanashiro AMI, Gama NMSQ. 2001. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descalvado. Arq. Instituto de Biologia. 68(1):19-22. URL: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V68\\_1/4.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V68_1/4.pdf)

Carrijo AO, Liz RS, Makishima N. 2002. Fiber of green coconut shell as an agricultural substrate. Horticultura Brasileira. 20(4):533-535. English. URL: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362002000400003&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362002000400003&script=sci_abstract)

Carvalho JM, Maia GA, Sousa PHM, Maia GA. 2006. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. Ciências agrárias Londrina. 27(3):437-452. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744081013>

Choudhary R, Bandla S., Watson D, Haddock J. 2012. UV-C treatment of soymilk in coiled tube UV reactors for inactivation of *Escherichia coli* W1485 and *Bacillus cereus* endospores. Southern Illinois University Carbondale. LWT - Food Science and Technology 46(1):71-76. DOI: <https://10.1016/j.lwt.2011.10.024>

Costa LMC, Maia GA, Costa JMC, Figueiredo RW, Sousa PHM. 2005. Avaliação de água-de-coco obtida por diferentes métodos de conservação. Ciência e Agrotecnologia. 29(6), 1239-1247. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000600019>

Costa JMC, Alves MCS, Clemente E, Felipe EMF. 2006. Características físico-químicas e minerais de água de coco de frutos químicos e minerais de água de coco de frutos da variedade anã amarelo em diferentes períodos de maturação. Acta Scientiarum. Agronomy. 29(2):173-177. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v28i2.1029>

David PRBS, Fernandes ZF. 1998. Conservação de água de coco por refrigeração. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 16(1):1-12. DOI: <https://10.5380/cep.v16i1.13931>.

Dias FM, Figueiredo RM, Souza JR, Santana CMP. 2015. Qualidade Microbiológica da Água de Coco Comercializada em Carrinhos Ambulantes, na Região Central do Município de

Vitória da Conquista, BA. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. 17:97-103. DOI: [10.15871/1517-8595/rbpa.v17n1p97-103](https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v17n1p97-103)

Figueiroa GFO, Oliveira CLA. 2017. Avaliação de rótulos de embalagens de Águas de coco comercializadas em Natal, RN. Revista UNI-RN. [Internet] [accessed February 2020 10] <http://www.revistas.unirn.edu.br/index.php/revistaunirn/article/view/480>

Floriano L, 2017. Modelagem matemática da inativação de *Penicillium expansum* em suco de maçã por radiação ultravioleta [Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação]. Florianópolis (SC). Universidade Federal de Santa Catarina.

Fortes EP, Lima A, Cronemberger MGO, Crispim LS. 2006. Qualidade físico química e microbiológica das águas de coco envasadas, comercializadas em Teresina, Piauí. Revista Higiene Alimentar, São Paulo. 20(141):87-90. DOI: [10.5151/chenpro-5erq-fq3](https://doi.org/10.5151/chenpro-5erq-fq3)

Forsythe SJ. 2002. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre (Br). 1ed. Artmed.

Franco BDGM, Landgraf M. 2003. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo (SP): Atheneu.

Citação em texto (Franco and Langraf, 2003).

Gabriel AA. 2012. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and spoilage yeasts in germicidal UV-C-irradiated and heat-treated clear apple juice, Food Control. 25(A):425-432. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.011>

Gómez PL, Alzamora SM, Castro MA, Salvatori DM. 2010. Effect of Ultraviolet-C light dose on quality of cut-apple: Microorganism, color and compression behavior. Journal of Food Engineering. 98:60-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.12.008>

Guedes M, Novello D, Mendes G, Cristianini M. 2009. Tecnologia de ultravioleta para preservação de alimentos. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos 27(1):59-70 DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v27i1.14953>.

Guerrero-Beltrán, JA, Barbosa-Cánovas, GV. 2004. Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. Food Science and Technology International, 3(10):137-147. DOI: <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>

Hoffman FL, Coelho AR, Mansor AP, Takahashi CM, Vinturim TM. 2002. Qualidade microbiológica de amostras de água de coco vendidas por ambulantes na cidade de São José do Rio Preto – SP. Revista Higiene Alimentar. 16(97):87-92. URL: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/lil-320806?lang=en>

Instrução Normativa nº 27, de 22 de julho de 2009. Diário Oficial da União 23/07/2009. 221(1):6. Brasil.

Instrução Normativa Nº 60, de 23 De Dezembro de 2019. Diário Oficial da União 26/12/2019. 249(1):133. Brasil.

Instrução Normativa nº 9, de 30 de janeiro de 2020. Diário Oficial da União 31/01/2020. 22(1):38. Brasil.

Jesus NS, Valiatti TB, Barcelos IB, Romão NF, Marson RF, Sobral FOS. 2018. Avaliação microbiológica da água de coco comercializada no município de Ouro Preto do Oeste, Rondônia, Brasil. Revista Saúde e Desenvolvimento. 12(10):173-182. URL: <https://www.uninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/876>

Kneissl M, Rass, J. 2016. III Nitride ultraviolet emitters – technology and applications. Springer. New York.

Koutchma, T. 2009. Advances in ultraviolet light technology for non thermal processing of liquid food. Food bioprocess technology. 2:138-155. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0178-3>

López-Malo A, Palou E. 2004. Ultraviolet Light and Food Preservation. DOI: <https://10.1201/9780203997277.ch18>.

Magalhaes MP, Gomes FS, Godesta RCD, Matta VM, Cabral LMC. 2005. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. 25(1):72-77. DOI: <https://10.1590/S0101-20612005000100012>

Manzocco L, Plazzotta S, Maifreni M, Calligaris S, Anese M, Nicoli MC. 2016. Impact of UV-C light on storage quality of fresh-cut pineapple in two different packages. LWT-Food Science and Technology. 65(1):1138-1143. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.007>

Marquis REE, Baldeck JD. 2007. Sporocidal interactions of ultraviolet irradiation and hydrogen peroxide related to aseptic technology. Chemical Engineering and Processing. 46(6):547-553. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.07.009>

Mcdonald K, Sun D. 2008. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. International Journal of Food Microbiology. 128(1):2-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00126-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00126-9)

Messa SP, Nespolo CR, Sehn CP, Pinheiro FC, Ferreira MB, Soares GM. 2019. Desenvolvimento de Alimento Probiótico de Leite de Coco Sem Açúcar Adicionado. Revista contexto e saúde. DOI: <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2019.37.52-58>

Ministério da Saúde do Brasil. 2011; Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. Brasília, Distrito Federal. Brasil

Müller A, Pietsch VL, Schneelee JS, Stahl MR, Greiner R, Posten C. 2015. Effect of temperature and pH value on the UV-C sensitivity of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum*. LWT - Food Science and Technology. 64(2):699-705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.013>

Oliveira HJS, Abreu CMP, Santos CD, Cardoso MG, Teixeira JEC, Guimarães NCC. 2003. Carbohydrate measurements on four brands of coconut water. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 27(5):1063-1067. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000500013>

Pereira D. 2010. Importância da Cadeia de Frio na Segurança Alimentar de Produtos Congelados e Refrigerados. [Dissertação de Mestrado]. Coimbra. Escola Superior Agrária de Coimbra.

Perera N, Gamage TV, Wakeling L, Gamlath GGS, Versteeg C. 2010. Colour and texture of apples high pressure processed in Pineapple juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 11(3):39-46. English. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.003>

Petrus RR. 2000. Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de bebida isotônica acondicionada em garrafa plástica asséptica. [Dissertação de Mestrado]. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.

Pinto ROM. 2017. Avaliação da eficiência do processamento de água de coco por micro-ondas. [Dissertação de mestrado]. São Paulo. Faculdade de ciências farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

Pinto J, Neves R. 2010. Análise de riscos no processamento alimentar. Porto (PT). Editora Publindústria. Edições Técnicas.

Prades A, Dornier M, Diop N, Pain J. 2012. Coconut water preservation and processing: A review. Fruits. 67(3):157-171. English. DOI: <https://doi.org/10.1051/fruits/2012009>

Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União 10/01/2001. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil

Resolução da Diretoria Colegiada nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União. 29 de janeiro de 2001. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil

Resolução da Diretoria Colegiada nº 331 de 23 de dezembro de 2019. Diário Oficial da União 26/12/2019. 249(1):96. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil.

Rosa MF, Abreu FAP. 2000. Água-de-coco: métodos de conservação. Embrapa Agroindústria Tropical. [Internet]. [acessed April 2020 12] [40.p] <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/4873/1/Dc-037.pdf>

Saabor A, Lopes LHS, Cunha MM, Fernandes C. – 2000. Coco verde: Ministério da Integração Nacional – Ministério da integração, Brasília DF. [Internet]. [acessed March 2020 9] [4.p] [http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_2616.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2616.pdf)

Salfinger Y, Tortorello ML. 2015. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5<sup>th</sup> Edition. American Public Health Association.

Santos FEJ, Teixeira BEL, Moreira SI, Sousa CF, Castro SD. 2013. Avaliação microbiológica de água de coco comercializada por ambulante em Juazeiro do Norte – CE. Revista verde (Mossoró – RN). 8(2):12-28. <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/2071>

Santos RB, Silva JM, Silva CS, Nascimento MS, Santos TMC, Costa JHQ. 2019. Global Science and Technology, Rio Verde. 12(1):43-52. <https://rv.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/gst/article/view/1070>

Silva CRS, Maia GA, Rodrigues MCP, Costa JMC, Figueiredo RW, Sousa PHM, Fernandes AG. 2003. Estabilidade da água de coco submetida ao processo “hot-pack”. Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias. 9(3):15-21. DOI: <https://doi.org/10.5212/publicatio.v9i03.810>

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki, MM. 2017. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. São Paulo (Br): Blucher.

Silva MSJ, Júnior DLS, Braz MLO, Correia CS, Mendes RC, Marques AEF. 2020. Avaliação físico-química e microbiológica de águas de coco produzidas na cidade de Juazeiro do Norte, Ceará. Revista Saúde (Santa Maria). 46(1):1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/2236583441265>.



Sousa, CR. 2006. Avaliação de processo de produção de água de coco (*Cocos nucifera*) por ultrafiltração e envase asséptico em garrafas de vidro. [Dissertação de Mestrado]. Campinas. Universidade Estadual de Campinas.

Souza ACF, Souza JF. 2019. Avaliação microbiológica de água de coco-verde (*cocos nucifera*) comercializada nos quiosques da praça do coco, cidade de Macapá-Amapá. Biota Amazônia. 9(3):57-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v9n3p57-58>

Sousa CP. 2006. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. Revista APS. 9(1):83-88. URL: <https://www.ufjf.br/nates/files/2009/12/Seguranca.pdf>

Steele R, Editor. 2004. Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food. Sawston (CB): Woodhead Publishing.

Sucupira NR. 2016. Efeito do processo uht (ultra high temperature) nas Características químicas, enzimáticas e sensoriais de água de Coco (*cocos nucifera*), [Tese de doutorado]. Fortaleza. Universidade Federal Do Ceará.

Syamaladevi RM, Lu X, Sablani SS, Insan SK, Adhikari A, Killinger K, Rasco B, Dhingra A, Bandyopadhyay A, Annapure U. 2013. Inactivation of *Escherichia Coli* population on fruit surfaces using ultravioleta-C light: Influence of fruit surface characteristics. Food Bioprocess Technology. 6:2959-2973. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0989-0>

Templeton MR, Andrews RC, Hofmann R. 2006. Impact of iron particles in groundwater on the UV inactivation of bacteriophages MS2 and T4. J Appl Microbiol 101(3):732–741. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02980.x>

Tremarin A, Brandão TRS, Silva CLM. 2016. Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus Acidoterrestris* in apple juice submitted to ultraviolet radiation. Food Control. 73(A):18-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.008>

Ukuku DO, Geveke DJ. 2010. A combined treatment of UV-light and radio frequency electric field for the inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple juice. International Journal of Food Microbiology, 138(1-2):50-55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.004>

Viana AC, Borges CRM, Gomes MR, Carvalho JR, Vale RB. 2019. Análise microbiológica de superfície e ambiente em diferentes restaurantes e lanchonetes na cidade de Petrolina-PE. Anais da XIV JINCE/JID 2019. 1:122. <https://periodicos.ifsertao-pe.edu.br/ojs2/index.php/jince/article/view/1041/394>

Walter EHM, Kuaye AY, Hoorfar J. 2014. Case study on the safety and sustainability of fresh bottled coconut water. In: Global Safety of Fresh Produce. Elsevier. 11:367-382. DOI: <https://doi.org/10.1533/9781782420279.5.367>

Wright JR, Summer SS, Hackney CR, Pierson MD, Zoecklein BW. 2000. Efficacy of ultraviolet light for reducing *Escherichia coli* o157:H7 in unpasteurized apple cider. J. Food Protect. 63:563-567. DOI: <http://10.4315/0362-028X-63.5.563>